Immunologische Zellmarker auf Lymphoblasten und auf den Lymphozyten dieser Patienten nach einjähriger Kombinationszytostase

von

H. U. SCHWENK

Aus der Kinderklinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Windorfer

Immunologische Zellmarker auf Lymphoblasten und auf den Lymphozyten dieser Patienten nach einjähriger Kombinationszytostase

Dem Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

als

HABILITATIONSSCHRIFT

vorgelegt von

H. U. SCHWENK

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
I. ZELLMARKER AUF LYMPHOIDZELLEN	1
1. Die physiologische Lymphozytendifferenzierung	1
2. Humane Zellmarker von Lymphozytensubpopulationen	3
3. Zellmarker bei Immunmangelkrankheiten	4
4. Funktion der Oberflächen-Zellmarker	5
5. Lymphoproliferative Erkrankungen	7
a) Chronische Lymphadenose	8
b) Burkitt-Lymphom	9
c) Morbus Hodgkin	10
d) Maligne Lymphome	10
e) Akute Lymphoblastenleukämie	11
f) Sézary-Syndrom	11
g) Eigenes Vorhaben	12
II. METHODIK	13
A. Rosettentest	13
1. Lymphozytenisolierung	13
2. Schafserythrozyten	14
3. Trypsinbehandlung der Erythrozyten	18
4. Lymphozyten	20
B. Membranimmunfluoreszenztest	22
C. Mikroskopie	25
D. Modifikation beider Testsysteme für den Einsatz bei lymphopenischen Kindern	26
III. DIFFERENZIERUNG DER AKUTEN LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE	28
1. Differenzierung mittels klinischer Parameter	29
2. Differenzierung mittels zytologischer und zytochemischer Parameter	30

Seite

IV. IMMUNOLOGISCHE ZELLMARKER AUF LYMPHOBLASTEN VON AKUTER LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE IM KINDESALTER 31

V. IMMUNOLOGISCHE ZELLMARKER AUF BLASTEN VON LEUKÄMISCH-TRANSFORMIERTEN MALIGNEN LYMPHOMEN IM KINDESALTER 41

VI. LYMPHOZYTENVERTEILUNG BEI PATIENTEN IN ERSTER REMISSION EINER AKUTEN LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE WÄHREND DER KOMBINATIONSZYTOSTASE 51

ZUSAMMENFASSUNG 64

LITERATUR 65

EINLEITUNG

In den vergangenen 20 Jahren wurde durch intensive experimentelle Forschung gefunden, daß fast alle Tumoren im Tierreich tumorspezifische (besser tumorassoziierte) Antigene besitzen (SJÖGREN, 1965, G.KLEIN, 1966, HELLSTRÖM et al., 1969). Und zudem lassen sich regelmäßig immunologische Abwehrmechanismen gegen diese Tumoren nachweisen (OLD und BOYSE, 1964). Insbesondere kann bei einer lymphoproliferativen Erkrankung im Tierreich bereits durch eine spezifische Impfung das Angehen von Tumoren verhindert werden (Übersicht bei BENGELSDORFF und BERNHARDT, 1972). Obwohl so unser Wissen auf dem Gebiet der Tumorimmunologie in den letzten Jahren wesentlich erweitert wurde, konnte hieraus erstaunlicherweise leider kein entscheidender Fortschritt für die Diagnostik und Therapie humaner maligner neoplastischer Erkrankungen abgeleitet werden. Die vorgelegte Arbeit versucht, hier Ansatzpunkte aufzuzeigen.

I. ZELLMARKER AUF LYMPHOIDZELLEN

1. Die physiologische Lymphozytendifferenzierung

Die hämopoetische Stammzelle wandert aus dem Dottersack, unter dem Einfluß der Mikroumgebung, zunächst in die fetale Leber und dann in das Knochenmark ein. Sie differenziert sich dabei in die myelopoetische und lymphopoetische Stammzelle (METCALF und MOORE, 1971). Die Untersuchungen von GLICK et al. (1956) zeigten, daß die Weiterentwicklung der Lymphozyten beim Huhn in einer Bursa-Fabricii-abhängigen B-Zell-Linie und einer davon getrennten thymusabhängigen T-Zell-Linie abläuft. Der Arbeitskreis um GOOD (1971) erkannte, daß diese getrennte Differenzierung der Lymphozyten auch für alle Säugetiere gilt. Von COOPER und LAWTON (1972) wurde anhand von verschiedenen Immunmangelkrankheiten gezeigt, daß diese Einteilung auch für den Menschen berechtigt ist. Ein Teil der Stammzellen gelangt in der frühen Embryonalphase in den Thymus. Dort differenzieren sie sich zu

Lymphozyten weiter. Ein anderer Teil der lymphatischen Stammzellen entwickelt sich im Bursaäquivalent, dem wahrscheinlich das menschliche Knochenmark und nicht das darmassoziierte Lymphgewebe entspricht (ABDOU, 1972), zu B-Lymphozyten. Die frühe B-Zellentwicklung ist antigenunabhängig, die spätere Differenzierung in sogenannte aktivierte B-Zellen antigenabhängig. Außerdem tritt in diesem Stadium eine Kooperation mit den T-Zellen auf. Zu keinem Zeitpunkt wird aber in der physiologischen Entwicklung eine Umwandlung eines T-Lymphozyten in einen B-Lymphozyten beobachtet.

Das Endprodukt der B-Zell-Linie ist die Plasmazelle, die Antikörper der verschiedenen Klassen produzieren und sezernieren kann. Die T-Zell-Linie kann unter dem Einfluß eines Antigens zu aktivierten T-Zellen einerseits und zur sogenannten "Helfer-T-Zelle" andererseits differenzieren. Letztere hat wiederum einen Einfluß auf die antigenabhängige Entwicklung der B-Zell-Linie. Am besten können, auch beim Menschen, diese komplizierten Vorgänge durch die Untersuchung mittels sogenannter Differenzierungsmarker aufgeklärt werden. So finden sich schon in der 9. embryonalen Lebenswoche einige wenige membranimmunglobulintragende Lymphozyten (B-Zellmarker) und mit 14 Wochen hat der menschliche Embryo auf seinen B-Lymphozyten bereits dieselbe Verteilung der einzelnen Klassen an Membranimmunglobulinen wie der Erwachsene. Reife T-Lymphozyten sind zum anderen bereits in der 18. Schwangerschaftswoche, zunächst nur im Thymus, nachweisbar (WYBRAN et al., 1972).

Die humane Immunregulation entsteht nun durch eine Zellkooperation dieser beschriebenen verschiedenen Zelltypen. Aber von einer zellulären und molekularen Erklärung der Immunantwort oder der Immuntoleranz sind wir noch weit entfernt. Die gefundenen Resultate bei der Maus dürfen wegen ihrer Speziesspezifität nur mit Vorbehalt auf den Menschen übertragen werden. Jedoch wird der Einsatz von verschiedenen Zellmarkern sicherlich

dazu beitragen, diese komplexen Vorgänge aufzuhellen. Eine klinische Bedeutung ist bisher noch nicht abzusehen.

Dagegen wird erwartet, daß die Benützung dieser verschiedenen Differenzierungszellmarker von Lymphozyten schon bald für die sogenannten "lymphoproliferativen Erkrankungen" praktisch verwertbare Bedeutung erlangt. Denn diese stellen eine Störung der physiologischen Lymphozytenentwicklung dar (SELIGMANN, 1974).

2. Humane Zellmarker von Lymphozytensubpopulationen

Es handelt sich dabei um Strukturen an der Oberfläche von Lymphozyten, die diese Zellen eindeutig definieren. Ihre Entdeckung geht von den Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen vor allem bei der Maus aus. (Dort tragen B-Zellen außer Membranimmunglobulinen das Heteroantigen MBLA und entwickeln bei der Differenzierung zu Plasmazellen das Heteroantigen MSPCA und das Alloantigen PC-1. Die T-Zellen sind charakterisiert durch die Alloantigene Theta (RAFF, 1971) und die LyA, -B und -C-Systeme (BOYSE, 1968) während die Thymozyten noch die TL-Antigene exprimieren.) Bei Menschen finden wir auch auf den B-Lymphozyten Membranimmunglobuline (Tab.1), aber zahlreiche andere Antigene

B-Lymphozyten	1. Membranimmunglobuline
	2. B-Zellantigene $^{+}$
	3. Rezeptor für C_{3d}
	4. Rezeptor für Epstein-Barr-Virus
	5. Rezeptor für Fc Fragment von IgG_1-IgG_4
T-Lymphozyten	6. Rezeptor für Schafserythrozytenantigen
	7. T-Zellantigene $^{+}$
aktivierte T-Lymphozyten	Kombination von 5 - 7

$^{+}$nachgewiesen durch heterologe Antiseren

Tab.1: Zellmarker an der Oberfläche von humanen Lymphozytenpopulationen

sind nicht nachweisbar und in jeder Spezies müssen die Zellmarker erneut auf ihre Validität geprüft werden, denn die analoge Übertragung der Resultate vom Tier auf den Menschen ist nicht erlaubt. Dagegen kann die biologische Bedeutung der humanen Zellmarker am besten durch die Untersuchungen von Immunmangelkrankheiten erkannt werden.

3. Zellmarker bei Immunmangelkrankheiten

Bei dem di George-Syndrom handelt es sich um eine Fehlbildung im Bereich der 3. und 4. Schlundtasche, die die Normalentwicklung eines Thymus verhindert. Diese Kinder leiden bereits in der frühen Säuglingszeit an schweren rezidivierenden, polytopen Infektionen, außerdem haben sie meist Zeichen eines Hypoparathyreoidismus (Tetanie). Im Blut findet sich eine kompensatorische Vermehrung der B-Lymphozyten auf über 80 % (GAJL-PECZALSKA et al., 1972). Dagegen sind die T-Zellen stark vermindert. Dieselbe Verminderung an T-Zellen findet man bei manchen schweren kombinierten Immundefekten. Unterschiedliche T-Zellverminderung, nachgewiesen im Rosettentest, haben die Ataxia teleangiectatica und das Wiskott-Aldrich-Syndrom (SCHWENK et al., 1974). Bei den Patienten mit Hypogammaglobulinämien findet sich ein ganz heterogenes Bild. Zum Teil sind die B-Zellen nachgewiesen durch Membranimmunglobuline, normal vorhanden, zum Teil vermindert, zum Teil erhöht (LUCKASEN et al., 1974). Die meisten dieser Patienten besitzen auf ihren Lymphozyten, wenn auch die Membranimmunglobuline fehlen, den Rezeptor für die Komplementkomponente, ein Hinweis, daß bei der Entwicklung der verschiedenen Zellmarker dieser Rezeptor den Membranimmunglobulinen vorausgeht. Bei dem Krankheitsbild der Agammaglobulinämie (Bruton) fehlen in der Regel die membranimmunglobulintragenden B-Lymphozyten Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA. IgE ist jedoch auf den Lymphozyten nachweisbar (GAJL-PECZALSKA et al., 1973). In Zukunft kann die große Gruppe der variablen Immunmangelkrankheiten entsprechend der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation

(FUDENBERG et al., 1971) durch Untersuchung von Lymphozyten-Zellmarkern sicher besser eingeteilt werden. Dies insbesondere, wenn die T-Lymphozyten noch weiter differenziert werden können, vor allem durch eine Markierung der Suppressor-T-Lymphozyten.

4. Funktion der Oberflächen-Zellmarker

Vor über 70 Jahren wurde von EHRLICH (1901) vermutet, daß Antigenrezeptoren sich auf der Oberfläche von immunkompetenten Zellen befinden. Dieselbe Hypothese wurde dann von BURNET (1957) erneut formuliert und erweitert mit der Vorstellung, daß die Zelle, nachdem sie mit dem spezifischen Antigen in Kontakt geraten ist, durch einen "Triggermechanismus" proliferiert. Und in einer clonalen Expansion den zunächst nur an der Membranoberfläche vorliegenden Antikörper in größerem Ausmaß produziert. Durch verschiedene Untersuchungen u.a. von BRETSCHER und COHN (1968) wurde gezeigt, daß die Interaktion der immunkompetenten Zelle mit dem Antigen aber auch zur Immuntoleranz führen kann. Außer dieser Lymphozytenaktivierung bzw. -paralysis ist aber den Membranimmunglobulinen auch noch eine Aufgabe in der Antigenpräsentation zuzurechnen. Denn durch die Experimente von BASTEN et al. (1972) wissen wir, daß die B-Lymphozyten rezirkulieren,und es ist möglich, daß sie als Transportvehikel für ein Antigen dienen können und dieses an den geeigneten Stellen dadurch konzentrieren.

Bei den Untersuchungen von PERLMANN et al. (1972) wird vermutet, daß der Fc-Rezeptor eine wesentliche Bedeutung für die durch Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität besitzt, denn nach seinen Vorstellungen kann diese Zellgruppe Tumorzellen zerstören, die mit Immunglobulinen belegt sind. Die Lymphozyten haften sich nämlich mit ihrem Fc-Rezeptor für das IgG-Molekül an diesen Immunglobulinen fest. Und nach dieser Brückenbildung kommt es zur Tumorzellzerstörung. Auch für die Rezeptoren für verschiedene Komplementkomponenten wurdenvon DUKOR und HARTMANN (1973) verschiedene Modelle vorgestellt, wie diese Strukturen für die

Initiation der Immunantwort verantwortlich sein können. Daß auch T-Lymphozyten einen antigenspezifischen Rezeptor besitzen, ist durch viele Untersuchungen heute sicher (DWYER et al.,1972, BRONDZ, 1972, FELDMANN et al., 1973). Nur sein Nachweis ist sehr schwierig und die Struktur noch ungeklärt. Zum Teil wird vermutet, daß es sich auch um ein Immunglobulin (IgX?) handelt, so wurden von MARCHALONIS (1972) bis zu 500 Membranimmunglobulinmoleküle pro T-Lymphozyt nachgewiesen. Dagegen hat der Rezeptor für Schafserythrozyten wahrscheinlich keine immunologische Funktion. Er ist in seiner chemischen Struktur ebenfalls noch völlig ungeklärt. Daher haben wir uns in unserem methodischen Teil vor allem mit seiner Definierung beschäftigt. Es ist aber unwahrscheinlich, daß es sich nur um den Nachweis absorbierter Substanzen an der Oberfläche von T-Lymphozyten handelt. Dagegen sprechen auch Experimente, die wir in Abschnitt II dargestellt haben (Persistenz der Zellmarker bei einer isolierten, kontinuierlich wachsenden Zell-Linie). Ob die mittels heterologen Antiseren nachgewiesenen Membranantigene eine Funktion besitzen, ist heute noch nicht bekannt. Wir verzichteten auf die Herstellung eines solchen Antiserums. Denn einmal finden sich in verschiedenen Spezies natürliche Antikörper, die mit Zellmembranbestandteilen anderer Spezies kreuzreagieren, d.h. über die Spezifität kann trotz ausreichender Absorption nichts mit letzter Sicherheit ausgesagt werden. Zum anderen können die Antiseren nur selten in der Immunfluoreszenztechnik benützt werden, sondern nur in der Zytotoxizitätsreaktion, wo eine Einzelzellidentifikation nicht möglich ist.

Diese unterschiedlichen Oberflächenstrukturen von B-Lymphozyten, wie sie aber auch für die verschiedenen Untergruppen der T-Lymphozyten wahrscheinlich sind, erklärt ein weiteres Phänomen. Vor über 20 Jahren wurde von GOWANS beobachtet, daß bei Injektion von Thymuszellen in eine syngeneische Maus diese Zellen sich wieder im Thymus konzentrieren (homing), oder bei der Injektion von Milzzellen diese Zellen dann zum großen Teil wie-

derum in die Milz wandern. Für dieses funktionelle Verhalten müssen wiederum Oberflächenstrukturen verantwortlich sein, die sich von Organ zu Organ unterscheiden. Die Untersuchungen bei Menschen stehen erst an ihrem Anfang. So findet sich in den Lymphozyten der Tonsillen überwiegend eine Population mit zahlreichen Komplementrezeptoren (über 65 %), während im peripheren Blut nur ein kleinerer Prozentsatz der B-Lymphozyten einen Rezeptor für Komplement trägt (SIEGEL et al., 1974).

5. Lymphoproliferative Erkrankungen

Bei dieser Gruppe handelt es sich um eine Differenzierungsstörung und neoplastische Transformation von Lymphozyten. Und daher war es naheliegend, bei diesen Patienten ausgiebig die neoplastisch transformierten Zellen auf Marker an ihrer Oberfläche zu untersuchen. Einmal, um so eine mehr funktionelle Einsicht in den Entstehungsmechanismus dieser Krankheiten zu erzielen und zum anderen, um die bisher nur morphologische, oft willkürliche Klassifikation dieser heterogenen Krankheitsbilder auf eine einheitliche Basis zu stellen; sie (Tab.2) ist nur vorläufig, wo nicht

Immunologische Klassifikation
lymphoproliferativer Erkrankungen

	neoplastische Transformation von	
	B-Lymphozyten	T-Lymphozyten
1. Chronische Lymphadenose	●	
2. M. Waldenström	●	
3. Haarzelleukämie	●	
4. malignes Lymphom	teilw. ●	■
a) Burkitt Lymphom	●	
b) noduläres Lymphom	●	
c) M. Hodgkin	●	
5. Sézary-Syndrom		●
6. akute Lymphoblasten-leukämie im Kindesalter		teilw. ●

Tab.2: Immunologische Klassifikation von lymphoproliferativen Erkrankungen

zahlreiche verschiedene Zellmarker auf den proliferierenden Zellen untersucht wurden. Denn diese Differenzierungsstörung kann zur gleichzeitigen Expression von B- und T-Zellmarkern auf der Zelloberfläche einer Zelle führen (SHEVACH et al., 1974). Und bei isoliertem Nachweis eines Zellmarkers kann die Einteilung daher irreführend sein. Die neoplastische Transformation einer Zell-Linie bewirkt eine eingehende Änderung ihrer Membranstrukturen (BACH et al., 1969) und damit ist noch nicht sichergestellt, ob etwa durch den T-Zellrosettentest auf den proliferierenden Zellen dieselben Strukturen nachgewiesen werden wie auf normalen peripheren T-Lymphozyten (s.Abschnitt II A). Die Verteilung bzw. Konstanz der Zellmarker im Zellzyklus ist zudem noch völlig unbekannt. Insgesamt ist daher diese immunologische Klassifikation von lymphoproliferativen Erkrankungen noch durch zahlreiche experimentelle Daten zu stützen, bevor sie allgemein empfohlen werden kann.

5. a) Chronische Lymphadenose

Vor allem durch den Arbeitskreis um SELIGMANN wurde geklärt, daß die chronische Lymphadenose eine monoclonale Proliferation von B-Lymphozyten darstellt (PREUD'HOMME und SELIGMANN, 1972). Es wurde in der Regel bei einem Patienten nur eine leichte (λ oder $\varkappa$)-Kette gefunden. Meistens sind es Membranimmunglobuline der Klasse IgM. Wobei die Beladung mit Membranimmunglobulinen unterschiedlich ist, aber im Durchschnitt geringer als bei normalen B-Lymphozyten. Es handelt sich also bei der chronischen Lymphadenose um einen Differenzierungsstop der B-Lymphozyten. Ihr Sitz lokalisiert sich am Übergang von den reifen B-Lymphozyten zu den Plasmazellen, der sich auszeichnet durch den physiologischen Verlust der Membranimmunglobuline. Obwohl die meisten chronischen Lymphadenosen auf ihrer Oberfläche IgM besitzen, wurden auch wenige Fälle berichtet, wo eine echte biclonale Population gefunden wurde (PREUD'HOMME und SELIGMANN, 1972). Diese Befunde müssen jedoch mit großer Zurückhaltung be-

urteilt werden, da verschiedene Mechanismen Membranimmunglobuline vortäuschen können, obwohl es sich nur um andersartig absorbierte Immunglobuline handelt. Diese sind nur sicher nachzuweisen, indem man zunächst die Membranimmunglobuline abtrypsiniert und dann anschließend unter Kulturbedingungen die erneute Membranimmunglobulinbildung nachweist. Ohne diese zusätzlichen Untersuchungen ist die Einteilung von lymphoproliferativen Erkrankungen als B- oder T-zellzugehörig wertlos. Denn drei verschiedene Mechanismen können Membranimmunglobuline imitieren:

1. Die Membranimmunglobuline besitzen eine spezifische immunologische Aktivität gegen andere Immunglobuline.

2. An der Zelloberfläche werden Antigen-Antikörperkomplexe mittels des Fc-Rezeptors gebunden.

3. Da sich auf der Zelloberfläche ein Tumorantigen befand, wurde dieses durch einen Antikörper aus dem Serum belegt, der wiederum als Membranimmunglobulin imponiert.

Auf letzterem beruhen wahrscheinlich die Befunde von GUTTERMANN et al. (1973). Die Wertung der Resultate verschiedener Untersucher ergibt damit, daß das Fehlen oder der Nachweis von Membranimmunglobulinen noch nicht ausreicht, um die Art einer Erkrankung als B- oder T-Zellproliferation zu bezeichnen. Und so ist unsere Tabelle 2 in einigen Punkten noch vorläufig.

Beim Morbus Waldenström und der Haarzell-Leukämie, Erkrankungen, die im pädiatrischen Krankengut nicht vorkommen, handelt es sich ebenfalls um eine B-Zellproliferation, nachgewiesen durch Studium verschiedener Zellmarker (PREUD'HOMME und SELIGMANN, 1972).

5. b) Burkitt-Lymphom

Hier wurde von KLEIN et al. (1966) zum ersten Mal bei frischem Biopsiematerial gefunden, daß verschiedene Immunglobuline in der Zelloberfläche nachweisbar waren, und OSUNKOYA et al. (1969) konnten zeigen, daß nach Trypsinbehandlung die Membranimmun-

globuline bald erneut erscheinen. Von ESEKLAND und KLEIN (1973) wurde geschätzt, daß im Durchschnitt pro Lymphomzelle 10^5 Moleküle IgM in monomerer Form sich an der Zelloberfläche befinden.

5. c) Morbus Hodgkin

Für mehrere Jahrzehnte nahm man an, daß die Hodgkinzelle wegen ihrer Morphologie, den Hystiozyten zuzuordnen ist. Durch zytochemische Untersuchungen (DORFMANN, 1964) wurde dem später widersprochen. Immunologen (ORDER und HELLMAN, 1972) vermuteten dann, daß es sich um neoplastisch transformierte T-Zellen handelt, da primär häufig die thymusabhängige Region der Lymphknoten befallen ist und die reduzierten zellvermittelten Immunreaktionen für einen Ausfall des T-Zellsystems sprachen. Untersuchungen mit Zellmarkern wurden bisher kaum durchgeführt. KADIN et al. (1974) fand aber, daß Hodgkinzellen keine spontane Rosettenbildung zeigen (T-Zellmarker), außerdem auf ihrer Oberfläche ein 'B-Zellantigen' nachweisen lassen. Zudem wurde von dem Arbeitskreis um MATHÉ (1974) wahrscheinlich gemacht, daß an der Oberfläche sich Rezeptoren für eine Komplementkomponente befinden.

5. d) Maligne Lymphome

Kindliche maligne - nicht Hodgkin - Lymphome wurden bisher kaum untersucht. Beim Erwachsenen wurden vor allem Untersuchungen im peripheren Blut, nur selten am Tumor vorgenommen. AISENBERG und BLOCH (1972) fanden von 34 Patienten bei 20 IgM auf den Blasten im Blut. PIESSIENS et al. (1973) wiesen multiple Immunglobulinklassen auf den Zellen nach. Die meisten Untersucher fanden, daß die Intensität der Membranfluoreszenz erhöht und damit die Beladung der Oberfläche der Zellen mit Immunglobulinen wesentlich stärker ist als bei der chronischen Lymphadenose. Bei Untersuchung des Tumorgewebes fanden JAFFÉ et al. (1974), daß das noduläre Lymphom sich aus dem Lymphfollikel entwickelt und die Tumorzellen B-Zelleigenschaften (Rezeptor für die Komplementkomponente)

tragen. Die einzigen drei kindlichen mediastinalen Lymphome, über die bisher in der Literatur berichtet wurde, werden ausgiebig in Abschnitt V diskutiert werden. Davon zeigten zwei Patienten T-Zellcharakteristika auf den Lymphoidzellen, ein Patient B-Zellcharakteristika.

5. e) Die akute Lymphoblastenleukämie

WILSON und NOSSAL (1971) konnten auf Lymphoblasten keine Membranimmunglobuline entdecken, ebensowenig GUTTERMANN. Dagegen berichtet COOPER (1973) über geringe Mengen von Membranimmunglobulinen auf Lymphoblasten und PREUD'HOMME und SELIGMANN beobachteten einen Fall mit akuter Lymphoblastenleukämie, ohne das Alter des Patienten anzugeben, wobei sich auf den Blasten ebenfalls Membranimmunglobuline nachweisen ließen.

5. f) Das Sézary-Syndrom

SELIGMANN et al. (1973) zeigten, daß bei sämtlichen untersuchten Fällen von Sézary-Syndrom (7/7 Patienten) die Lymphoidzellen T-Zellcharakteristika aufwiesen.

Zusammenfassend werden die lymphoproliferativen Erkrankungen durch die Untersuchungen von zahlreichen (!) Zellmarkern einer funktionelleren Einteilung zugeführt, zum andern, da diese Krankheiten auf einer Differenzierungsstörung beruhen, pathogenetische Mechanismen dargestellt. Dagegen kann man bei der Diagnostik dieser Erkrankungen (bis eventuell auf eine frühzeitige Diagnosestellung einer chronischen Lymphadenose) auf diese Untersuchungen verzichten. Ungeklärt ist aber, ob nicht durch den Einsatz dieser Differenzierungsmarker eine lymphoproliferative Erkrankung noch differenziert werden kann in Krankheitsuntergruppen mit unterschiedlicher Verlaufsform. Und dies ist das Anliegen dieser Arbeit.

5. g) Eigenes Vorhaben

Kindliche Lymphome und Leukämien verursachen rund 30 % der Todesfälle im Kindesalter (LAMPERT, 1972). Damit macht diese Krankheitsgruppe, obwohl in den letzten Jahren einige wesentliche Verbesserungen erzielt wurden, noch einen sehr großen Prozentsatz tödlich verlaufender Krankheiten im Kindesalter aus. Der Verlauf in einer Erkrankungsgruppe ist dabei trotz identischer Therapie erstaunlich verschiedenartig. Bei der akuten Lymphoblastenleukämie erreichen im Durchschnitt rund 90 % der Kinder eine hämatologische und klinische erste Vollremission. Und dann ist zu erwarten, daß ein großer Teil eine Langzeitremission (Heilung?) erwarten darf. Aber immer noch um 40 % (mit Unterschieden in den einzelnen Behandlungszentren) erleiden ein frühes hämatologisches Rezidiv und über 10 % einen manifesten ZNS-Befall (trotz prophylaktischer ZNS-Bestrahlung). (Im Krankengut der Erlanger Universitätskinderklinik in den letzten 3 Jahren 7 von 26 Kindern!) Im Abschnitt III wurde nun dargestellt, daß in ersten Untersuchungen der Literatur auf den Lymphoblasten verschiedene Zellmarker beobachtet wurden, auf den klinischen Verlauf dieser Patienten wurde dabei jedoch nicht eingegangen. Gibt nun die Differenzierung der Blasten mittels Zellmarker bei der Diagnosestellung einen Hinweis, welcher Patient zu der Patientengruppe mit erhöhtem Risiko gehört? Dies ist von großer klinischer Bedeutung. Denn unsere derzeitige Therapie (Kombinationszytostase, prophylaktische ZNS-Bestrahlung, beim Lymphom Bestrahlung des Primärtumors) ist so hoch dosiert, daß die Therapiekomplikationen bereits über 10 % Todesfälle verursachen (SIMONE et al.,1972). So ist es nicht mehr möglich, unsere Therapieintensität noch weiter zu steigern, um die bisherigen hohen Risikofälle in eine längere Remission überführen zu können. Denn dies müßte erkauft werden mit schweren Zwischenfällen bei Patienten, die diese massive Therapie gar nicht benötigen. Außerdem wurde beobachtet (zitiert bei PLÜSS, 1974), daß für manche Formen der akuten Lymphoblastenleukämie eine Thera-

pieintensivierung die Dauer der ersten kompletten Remission verkürzte. In einer ersten vorläufigen Mitteilung fanden CATOVSKY et al. (1974) sowie wir (SCHWENK, 1974), daß eventuell der Krankheitsverlauf initial durch Untersuchung der Zellmarkereigenschaften der Blasten vorausgesagt werden kann. Dies soll durch die vorliegende Arbeit beantwortet werden.

II. METHODIK

In der vorliegenden Arbeit wird nur über zwei Zellmarker eingehend berichtet: die spontane Rosettenbildung als T-Zellmarker und der Nachweis von Membranimmunglobulinen als B-Zellmarker (LAY et al.,1972, PERNIS, 1971). Insbesondere bemühten wir uns um eine Standardisierung des ersteren, da dies vordringlich ist, um die bisherige große Streubreite für Normalwerte von 18 bis über 70 % (WYBRAN et al.,1972, JONDAL et al., 1972) zu verbessern.

A. Rosettentest

1. Lymphozytenisolierung

Es wurde die Methode nach BÖYUM (1968) benützt, durch Flotation auf einem Ficoll^{R}-Hypaque^{R}-Gradienten (24 Teile 9 % V/W Ficoll^{R} (Pharmacia) und 10 Teilen 33,9 % V/W Hypaque^{R} (Winthrop))konnten die Lymphozyten abgetrennt werden. Bei Isolierungen mit Erythrozytenkontamination wurden diese durch trisgepufferte 0,83 % Ammoniumchloridlösung lysiert.

Da beide Teste nur an vitalen Zellen vorgenommen werden können bzw. die Resultate bei Verwendung von zerstörten Zellen verfälscht werden, ist zunächst die Vitalität der isolierten Zellfraktionen

nachzuweisen. Unsere Vitalitätstestung bei 20 Isolierungen von Normalpersonen ergab 96 + 2 % Trypanblau-Exklusion. Die Zellen enthielten noch einen Anteil von 4,5 % (Mittelwert von 20 Untersuchungen) Latexpartikel phagozytierende Zellen (Makrophagen). ZUCKER-FRANKLIN (1974) fand, daß bis zu 44 % Makrophagen die Lymphozytenfraktion bei dieser Isolierungsmethode kontaminieren können. Daher ist es notwendig, daß diese Zellen zusätzlich entfernt (SCHWENK et al., 1974a) oder durch phagozytierte Partikel markiert werden. Die Phagozytose wurde geprüft durch Inkubation des frisch gewonnenen Heparinblutes (20 E/ml) mit Latexpartikeln der Größe 2 μ (Difco) und Rotation auf einem Zellmixer der Fa. Heydolph für 15 Minuten.

Nur schwer nachweisbar und bisher noch nicht untersucht ist, ob die 40 - 50 % Lymphozyten, die nicht isoliert werden konnten, sich in der Verteilung der B:T-Zellen identisch verhalten wie die isolierte Fraktion. Das heißt somit, ob die isolierte Zellfraktion repräsentativ für die tatsächliche Blutzellverteilung ist. Dies wurde von allen übrigen Autoren bisher unterstellt. Untersuchungen an unfraktionierten Blutproben können aber aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Wichtig bleibt, daß bei allen Untersuchungen von Blutzellen mit hohem Makrophagenanteil, wie wir es besonders bei Immunmangelkrankheiten beobachteten (SCHWENK et al.,1974a), diese Zellen berücksichtigt werden.

2. Schafserythrozyten

Von 12 Schafen des Mikrobiologischen Instituts der Universität Zürich wurde gleichzeitig Blut gewonnen und in Alseverslösung aufgeschwemmt. Die Untersuchung, wiederholt mit dem Blut der gleichen Person durchgeführt, zeigte, daß das verwendete Tier nur einen geringen Einfluß auf das Ausmaß an Rosettenbildung besitzt.

Schaf Nr.	rosettenbildende / nicht-rosettenbildende		humane Lymphozyten (%)
1	53	52	47
2	58	59	57
3	54	56	57
4	48	53	54
5	50	52	54
6	55	56	55
7	51	57	57
8	56	55	50
9	49	51	51
10	53	56	55
11	57	59	59
12	55	51	56

Tab. 3: Rosettenbildende Kapazität der Erythrozyten von 12 verschiedenen Schafen (Lymphozyten von H.U.S., Test durchgeführt innerhalb 2 Tagen)

Die Untersuchungen an den Leukämiezellen, über die hier berichtet wird (außerhalb des methodischen Teils), wurden sämtlichst mit Hammelblut des hiesigen Hygiene-Instituts (Dir.: Prof.Dr.Knapp) durchgeführt. Dabei wurden 0,5 ml (0,5 %) Erythrozyten mit 1.10^6 Lymphozyten bei 0,5 C inkubiert entsprechend der Anleitung von LAY et al. (1971). Die Erythrozyten wurden zuvor dreimal in Phosphatpuffer (ph 7,1) gewaschen. Dabei bewegt man sich in einem Bereich des Erythrozytenüberschusses, und durch weitere Steigerung der Erythrozytenkonzentration auf 1 % konnte keine erhöhte Ausbeute erzielt werden. In orientierenden Experimenten beobachteten wir aber einen Rückgang des rosettenbildenden Anteils bei Reduktion der Erythrozytenkonzentration auf 0,1 %. Das heißt, für eine Standardisierung ist ein konstantes Verhältnis, Lymphozyten : Erythrozyten, notwendig.

Wir fanden eine Abhängigkeit von der Anzahl der Waschvorgänge

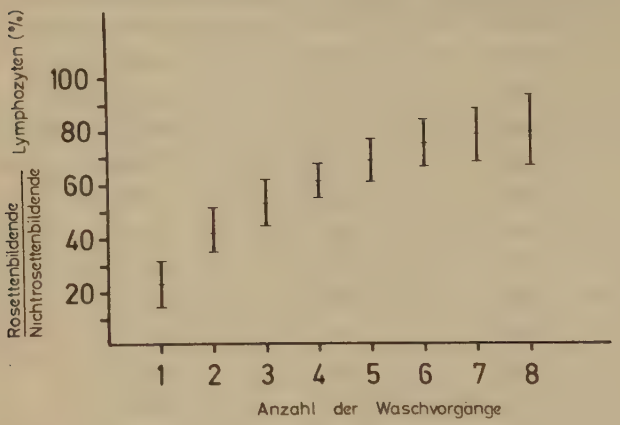

Abb.1: Rosettenausbeute in Abhängigkeit vom Waschgrad
(Mittelwert mit Standardabweichung)

Dies entspricht eventuell dem Befund von GALILI et al. (1974), da bei Vorbehandlung der Schafserythrozyten mit Neuraminidase die Rosettenbildung ebenfalls gesteigert ist. Wahrscheinlich führt die Enzymbehandlung und die wiederholte Waschprozedur zu einer Demaskierung der reagierenden Antigenstrukturen. Welche Rolle eine Veränderung der elektrischen Ladung, induziert durch diese Neuramidasebehandlung hat, ist noch ungeklärt (GALILI,1974). Die Oberflächenstruktur dieser Erythrozyten ist sehr komplex (WINZELER et al.,1967) und wahrscheinlich reagieren verschiedene Antigendeterminanten mit dem Rezeptor auf der Lymphozytenoberfläche. Und durch die erhöhte Waschzahl stehen mehrere solcher Antigendeterminanten zur Verfügung.

Genauso wie diese Antigendeterminanten ist unser biochemisches Wissen über die Rezeptoren noch sehr gering. Es ist nur wahr-

scheinlich, daß sie keine Immunglobuline darstellen, da meist keine Rosetteninhibition durch Inkubation mit Antiimmunglobulinen erreicht wurde (COOMBS et al., 1970, FRÖLAND et al., 1972). Aber im Gegensatz dazu steht der Befund von WYBRAN et al. (1972), der fand, daß ein Kaninchenantiserum für μ-Ketten die Rosettenbildung hemmt. Die Unterschiede sind nur erklärbar mit den gering verschiedenen experimentellen Bedingungen. Dies betont wiederum die große Bedeutung einer exakten Standardisierung. Die zahlreichen Inhibitionsversuche die angestellt wurden, so vor allem von dem Arbeitskreis um J.F.BACH (1970),sind in ihrer Aussage zweideutig. Denn es ist durch diese Untersuchungen nicht auszumachen, ob das zugesetzte Antiserum direkt am Rezeptor ansetzt oder nur über eine sterische Inhibition die Rosettenbildung verhindert.

Auch von anderen wurde die Abhängigkeit der Ausbeute an Rosetten von der Inkubationsdauer bestimmt (MERCIER, 1974). Das von uns gefundene Muster ist davon etwas unterschiedlich. Wir finden im Gegensatz dazu ein Plateau erst nach 3 Stunden, daher wurde die Inkubationsdauer auf 5 Stunden festgesetzt.

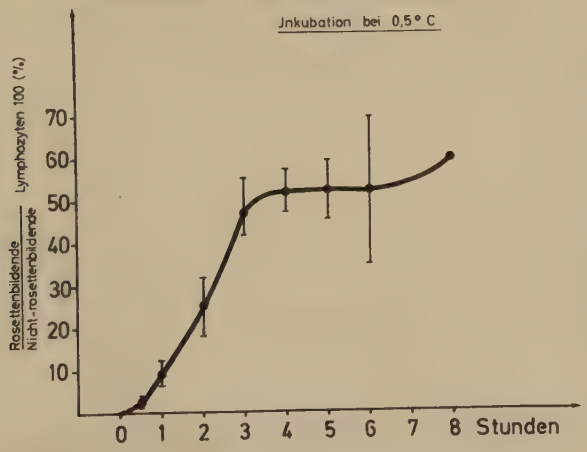

Abb. 2: Rosettenausbeute in der Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Mittelwert mit Standardabweichung)

3. Trypsinbehandlung der Erythrozyten

Eigene Untersuchungen zum Schafserythrozytenrezeptor

Eine wesentliche Voraussetzung für eine Verbesserung der Standardisierung des T-Zellmarkers ist die Aufklärung der chemischen Struktur des Antigens, das durch den Oberflächenzellrezeptor erfaßt wurde. Ausgehend von den Befunden von WEINER et al. (1973) suchten wir das Antigen durch Trypsinierung von der Erythrozytenoberfläche abzulösen.

Testansatz:

6 mal - zur Entfernung von Serumproteinen - in PBS (gepufferte Phosphatlösung) gewaschene frische Schafserythrozyten wurden für 30 Min. in PBS ph 8,1, 0,15 Mol bei 37° und unterschiedlichen Zusätzen von Enzygel® (Fa. Boehringer, Mannheim), trägergekoppeltes Trypsin, mit einer spezifischen Aktivität von 30 U/g inkubiert (s.Abb.3). Nach Zentrifugation zur Entfernung des Enzyms und der Erythrozyten (S.E.) wurde durch Inhibitionsversuche die Aktivität des abtrypsinierten Materials untersucht. Dabei wurden 1.10^6 Lymphozyten zunächst in 0,5 ml Überstand aufgeschwemmt und bei Zimmertemperatur 5 Min. inkubiert, dann wurde durch Zugabe der 0,5 %igen Erythrozytenlösung der Test komplettiert.

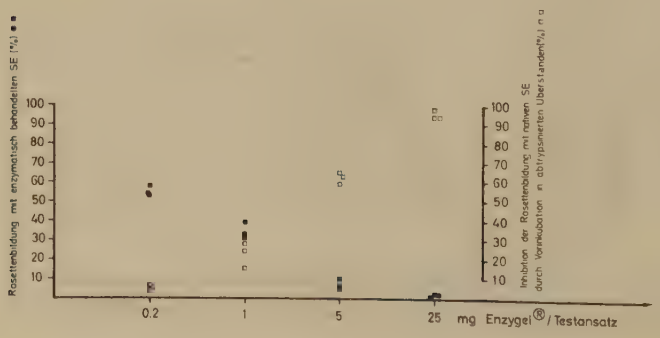

Abb.3: Inhibition der Rosettenbildung durch Trypsinbehandlung der Erythrozytenoberfläche in Abhängigkeit von der Trypsinkonzentration

Man erkennt bei einer hohen Trypsinkonzentration (50 mg/ml) eine starke Rosetteninhibition, d.h. die abtrypsinierten Fragmente besetzen den Rezeptor auf der Lymphozytenoberfläche. Wurden Lymphoblasten vom Patienten J.M. (s.Abschnitt IV) statt Lymphozyten verwendet, konnte mit den Überstandspräparationen dieselbe Inhibition an Rosettenbildung beobachtet werden. Dies ist somit der erste Hinweis, daß auf neoplastischen Zellen dieselben Membranstrukturen durch den Rosettentest nachgewiesen werden wie auf T-Lymphozyten (s.Abschnitt I 5). Der Überstand wurde lyophilisiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY (1951) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Nach 48stündiger Dialyse gegen PBS erfolgte die Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (Fluka) nach der Methode von CERBRA und GOLDSTEIN (1965).

Vier verschiedene Präparationen wurden hergestellt. Mit Ficoll-Hypaque^{R} isolierte Lymphozyten ergaben aber nur eine sehr kleine Zellpopulation, die Membranfluoreszenzen mit dieser Präparation zeigte (Tab.4).

	Membranfluoreszenz von Lymphozyten (%) mit 20 µl fluoreszein-markiertem Protein u. 10^5 Lymphozyten		Membranimmunfluoreszenz v.Lymphozyten (%) nach zusätzl.Inkubation in 50E Neuraminidase/ml	
Präparation 1	3,5^{+}	4,0^{++}	5,0^{+}	5,5^{++}
2	3,0	5,0	3,5	5,5
3	1,5	2,5	4,5	6,5
4	1,0	2,5	3,0	4,0

$^{+}$ 200 Zellen ausgezählt von H.U.S.

$^{++}$ 200 Zellen ausgezählt von G.H.

Tab.4: T-Zellmembranimmunfluoreszenz mit und ohne Neuraminidasebehandlung der Lymphozyten unter Verwendung von 4 fluoreszeinkonjugierten Proteinpräparaten

Damit liegt die Markierungsquote weit unter dem Erwartungswert. Die Ursache mag eine zu weitgehende Zerstörung der abgelösten Erythrozytenstrukturen sein. Durch diese fluoreszeinmarkierten Proteine kann der Schafserythrozytentest nicht ersetzt werden. Vielleicht ist mit einem anderen Enzym (oder durch Verkürzung der Inkubationsdauer) ein besser verwertbares Protein erhältlich. Wir führten jedoch derartige Untersuchungen nicht aus. In der Literatur gibt es hierzu keine Hinweise.

4. Lymphozyten

Der Test ist nach den Untersuchungen von MERCIER (1974) abhängig von der Ratio Erythrozyten zu Lymphozyten. Mit dem Verhältnis 0,5 ml 0,5 % Erythrozyten zu 1.10^6 Lymphozyten ist der Erythrozytenanteil so hoch gewählt, daß durch eine weitere Erhöhung keine Verbesserung der Rosettenbildung mehr erzielt werden kann. Eine Dosis-Wirkungskurve für den kritischen Bereich wurde von uns nicht erstellt. Dagegen kontrollierten wir das Verhalten der rosettenbildenden Zellen bei einer gesunden Person (H.U.S.), ohne Therapie, im Verlauf von 7 Monaten.

Tag	1	8	20	27	38	41	55	57	60	75	78	93
rosettenbildende Lymphozyten %	52	57	51	49	42	53	70	68	58	56	55	46
Tag	115	131	143	145	166	169	180	191	205	217		
rosettenbildende Lymphozyten %	53	55	54	73	52	48	61	56	55	59		

Tab.5: Verhalten der rosettenbildenden T-Lymphozyten bei einer gesunden Kontrollperson im Verlaufe von 7 Monaten

Der Schwankungsbereich zwischen 42 und 73 % rosettenbildender Zellen ist sehr groß. Der Wert mit 42 % wurde gemessen während

einer ausgeprägten Rhinitis, bei 46 % zwei Monate später waren aber keinerlei Krankheitserscheinungen mehr bei der Versuchsperson nachweisbar. Dieses Ergebnis mit einem Variationskoeffizienten $v_K = \frac{S \times 100}{\bar{x}}$ von = 13,4 % zeigt, daß als Standard nicht das Mitführen von einer beliebigen Kontrollperson wertvoll ist, insbesondere nicht beim Wechsel der Person. Daher ist die Etablierung von T-Zell-Linien, wie sie von uns gemeinsam mit Dr.Schneider vom Virologischen Institut (Dir.: Prof.Dr.H. zur Hausen) durchgeführt wurde, besonders wichtig.

Tabelle 6 zeigt im Vergleich die geringe Schwankung (v_K = 3,0 %) bei dieser Zell-Linie innerhalb von vier Monaten.

Tag	1	5	9	14	23	28	29	34	37	50	
rosettenbildende Lymphoblasten %	47	45	48	49	48	49	45	47	47	46	
Tag	52	57	60	66	71	74	75	79	89	91	93
rosettenbildende Lymphoblasten %	48	45	47	48	46	47	49	47	50	48	48

Tab. 6: Rosettenbildung einer in Kultur gehaltenen T-Zell-Linie (J.M.)

Daß diese Schwankungen nicht durch systematische Fehler verursacht werden, ergibt die 20fache parallele simultane Bestimmung der Rosettenbildung mit einem Variationskoeffizienten (v_K) von nur 2,4 % (Präzisionskontrolle). Die Zahl der an den Lymphozyten haftenden Erythrozyten ist stark variabel und schwankt bei unseren Untersuchungen zwischen 3 und 36 (bei Thymozyten). Dies wird wahrscheinlich durch eine unterschiedliche Ausprägung der Rezeptorstrukturen auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen bedingt sein.

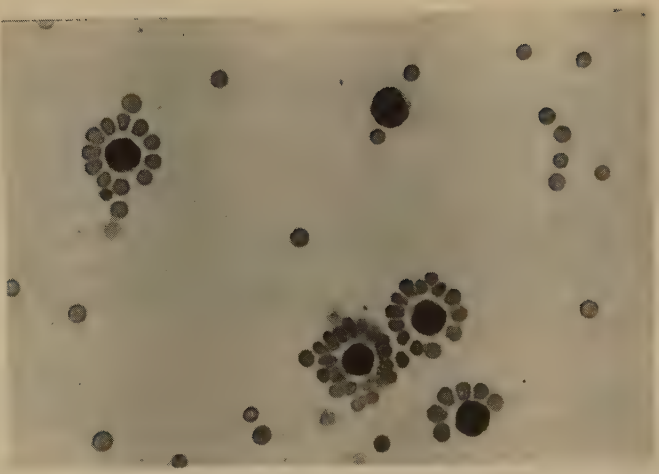

Abb. 4: Rosettenbildende T-Lymphozyten mit unterschiedlicher Rosettengröße

B. Membranimmunfluoreszenztest

Dieser Test ist bereits gut etabliert und die Normalwerte zeigen nicht die entsprechenden Schwankungen von Untersucher zu Untersucher wie bei dem Rosettentest, trotz Verwendung unterschiedlicher Antiseren. Wenn auch manche Autoren (GREY et al., 1971) eine vorwiegend IgG- und andere eine IgM-Membranfluoreszenz finden. Die Ursache kann sein, daß bei einem Teil der Untersucher die hohen IgG-Werte auf der Kontamination mit Makrophagen beruhen, die einen Rezeptor für IgG (FcFragment) tragen. Für diese Untersuchungen werden die 3 mal in PBS (gepufferte Phosphatlösung, ph 7,2) gewaschenen Zellen auf 1.10^6/ml eingestellt und davon 100 µl mit 10 µl Antiserum bei 4° C für 30 Min. inkubiert. Die Inkubationslösung enthielt außerdem 20 mg% NaN_3. Als Antiseren wurden fluoreszeinmarkierte poly-

valente Antihumanimmunglobuline von der Ziege verwendet (Fa. Behringwerke, Best.Nr. OTKO4). Unsere Normalwerte wurden bereits mitgeteilt (SCHWENK et al., 1974a). Auch bei diesen Untersuchungen wurde als Spezifitätskontrolle eine Vorinkubation mit nicht gekoppeltem Antiserum mitgeführt, die zu einer vollen Auslöschung der Fluoreszenz führte.

Um auszuschließen, daß aggregiertes Immunglobulin an den Fc-Rezeptor gebunden wurde, wurden alle Antiseren zunächst hochtourig (7000 U m/10 Min. Christ, Kühlzentrifuge) zentrifugiert. An Zellen die Latexpartikel phagozytierten wurde dann nie Membranimmungluoreszenz entdeckt.

Außerdem wurde bei Patienten Nr. 11 - 17 (s.Abschnitt III) mit einem Teil des Antiserums kontrolliert, daß nach einer Immunglobulinentfernung durch Affinitätschromatographie mit CNBr-aktivierter Sepharose^{R} (Pharmacia), entsprechend der Anleitung von AXEN et al. (1966), die Fluoreszenz weniger als 1 % der Zellen betrug. Somit ist ausgeschlossen, daß natürliche Antikörper gegen Membranbestandteile die Membranimmunfluoreszenz erzeugten.

Die Fluoreszenz war nie intrazellulär, da durch Zusatz von 20 mg% Natriumazid und einer Inkubationstemperatur von 4° C die Phagozytose verhindert wurde. Fluoreszenz und Zellkern fanden sich daher bei der Dunkelfeldmikroskopie nie in derselben Ebene (s.Abschnitt Mikroskopie).

Unterschiedliche Ergebnisse wurden berichtet bezüglich der Expression von Membranimmunglobulinen auf Nabelschnurlymphozyten und auf Zellen von chronischer Lymphadenose. Wahrscheinlich besitzen die polyvalenten kommerziellen Antiseren keine Antikörper gegen IgD (anti-δ). Dies erklärt auch, daß wir an Nabelschnurlymphozyten im Vergleich zu ROWE (1973) keine Erhöhung dieser H-Ketten fanden (SCHWENK et al., 1974).

Eine zusammenfassende Bewertung beider Zellmarker ergibt, daß im Gegensatz zum Rosettentest die Membranimmunglobuline auf B-Lymphozyten reproduzierbar erfaßt werden können und daß ihre in-vivo-Funktion zum Teil bereits bekannt ist. Unser Versuch,für die notwendige Standardisierung des Rosettentestes Wesentliches beizutragen, ergab:

1. Die Verwendung einer in Kultur gehaltenen transformierten T-Zell-Linie als Kontrollansatz bei jedem Versuch ist eine bessere Kontrolle als Lymphozyten von Normalpersonen.

2. Die biochemische Definierung des Schafserythrozytenantigens und dessen Verwendung im direkten Immunfluoreszenztest als T-Zellmarker war leider nicht erfolgreich.

Genauso wichtig ist die individuelle "biologische" Standardisierung dieser Testsysteme, wie sie an Immunmangelkrankheit, an Thymuszellen und chronischer Lymphadenose durchgeführt wurde (SCHWENK et al., 1974a). Denn nur dadurch kann nachgewiesen werden, daß die im Normalblut vorhandenen rosettenbildenden 50 - 60 % Lymphozyten T-Zelleigenschaften besitzen. Die Erzielung einer Ausbeute von 50 - 60 % allein reicht dagegen noch nicht zur "biologischen" Standardisierung aus.

Von PAPAMICHAIL et al. (1972) wurde durch Simultan-Untersuchungen ausgeschlossen, daß sich die membranimmunglobulintragende und rosettenbildende Lymphozytenpopulation überschneidet. Wir versuchten dies zu reproduzieren, aber nach 4 Stunden zusätzlicher Inkubation (ohne Natriumazid!) war die Fluoreszenz nur noch an wenigen Zellen (< 3 %) sichtbar. Bei Zusatz von Natriumazid kommt es dagegen zu einer deutlichen Reduktion der Rosettenbildung.

C. Mikroskopie

Wie andere Untersucher (PERNIS, GREY, PREUD'HOMME) benützten wir eine Auflichtimmunfluoreszenztechnik. Im Gegensatz zu diesen Untersuchern wurde die Morphologie der Zelle zuvor nicht im Phasenkontrast, sondern mit einer Dunkelfeldbeleuchtung kontrolliert. Nach unserer Ansicht ist hier die Zelldifferenzierung Granulozyten - Monozyten noch einfacher (s.Abb. 5 a). Zum anderen werden die stark lichtbrechenden Latexpartikel noch lichtstärker dargestellt.

Außerdem wird die Empfindlichkeit des fluoreszenzmarkierten Immunglobulinnachweises durch die vorausgegangene 5-minütige Fixierung des Zytozentrifugenpräparates mit Äthanol erhöht (persönliche Mitteilung von Prof. SELIGMANN).

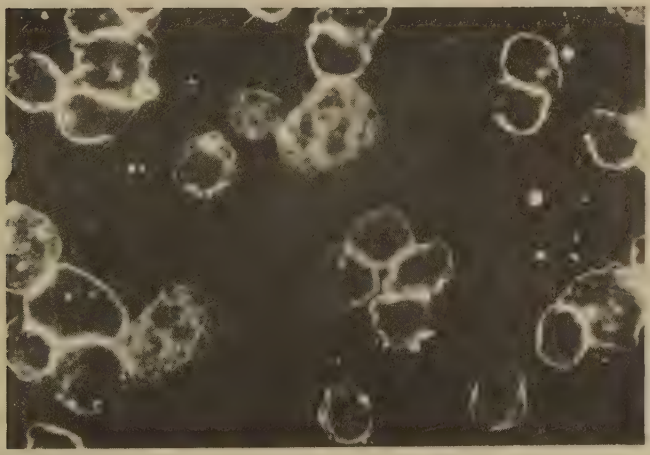

Abb. 5 a): Dunkelfeldbeleuchtung: kontaminierende Granulozyten sind deutlich zu erkennen

Abb. 5 b) Fluoreszenzbeleuchtung derselben Einstellung wie 5 a): einzelne kleine Lymphozyten zeigen fleckförmige Membranimmunfluoreszenz

Modifikation beider Testsysteme für den Einsatz bei lymphopenischen Kindern

a) Rosettentest

Für die hier durchgeführten Untersuchungen an zytostatisch behandelten Kindern entsprechend der Empfehlung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung, angelehnt an die Behandlungsrichtlinien des St. Jude Children's Research Hospital in Memphis (PINKEL et al., 1971), stehen nur sehr wenig Lymphozyten zur Verfügung. Denn die Kinder sind leuko- und lymphopenisch, mit einer Gesamtleukozytenzahl zwischen 2000 und 3500/mm^3 und meistens 10 - 30 % Lymphozyten. Daher haben wir zunächst den Rosettentest auf 1/10 des früher benutzten Testes in Volumen und Zellzahl reduziert. Somit wurde die Relation Erythrozyten zu Lymphozyten beibehalten und durch Paralleluntersuchungen nachgewiesen, daß identische Resultate damit erzielt werden.

b) Membranimmunfluoreszenztest

Wir beobachteten, daß die Fluoreszenz auf den B-Zellen unter der Kombinationszytostase (s.Abschnitt VI) häufig sehr schwach ausgeprägt ist. Zum anderen ließ sich bei einem Patienten mit akuter Myelose (R.R., Krbl.Nr. 5c/3158/74) auf den nativen Blasten unter Verwendung eines polyvalenten Antiserums zunächst eine deutliche Membranimmunfluoreszenz nachweisen. Diese verschwand aber nach einer 30-minütigen Inkubation in 100 µl Neuraminidaselösung (dem entsprechen 5 E Neuraminidase, Behringwerke Marburg in NaCl 0,14 M, $CaCl_2$ 0,003 M, $NaHCO_3$ 0,004 M) Es handelte sich also wahrscheinlich nicht um Membranimmunglobuline, sondern um Antikörper (gegen Tumorantigene?), die in der Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen wurden , aber durch Inkubation bei 37° C sich ablösten. Auf diese Inkubation (bzw. auf eine Trypsinbehandlung) wurde von GUTTERMAN et al. (1973) bei akuter Myelose verzichtet, daher ist nicht beurteilbar, von welcher Art die auf den Blasten nachgewiesenen Immunglobuline sind (vgl. Abschnitt I/5). Die Folge dieser Inkubation ist zudem, daß die Fluoreszenz auf Lymphozyten von zytostatisch behandelten Leukämiekindern in Remission wesentlich brillianter erscheint. Dagegen erzeugt diese Behandlung bei normalen Lymphozyten keine erhöhte membranimmunglobulintragende Zellfraktion (10 Untersuchungen von Normlymphozyten, Mittelwert $\bar{x}$ 23,5 %). Aus beiden angeführten Gründen wurde bei Patienten in Remission und an den Blasten im Schub immer diese Modifikation durchgeführt. Aus der Literatur ist uns dieser Effekt der Neuraminidasebehandlung von Lymphozyten nicht bekannt, während eine Erhöhung der spontanen Rosettenbildung durch Vorbehandlung der Lymphozyten und Erythrozyten mit Neuraminidase wiederholt beobachtet wurde (SEILER, 1972, GALILI, 1974). Um mit möglichst wenig Lymphozyten den Membranimmunfluoreszenztest ausführen zu können, wurden die Lymphozyten mittels einer Zytozentrifuge auf die Objektträger geschleudert.

III. DIFFERENZIERUNG DER AKUTEN LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE

Im Abschnitt I/5 haben wir bereits erwähnt, wie unterschiedlich der Verlauf einer akuten Lymphoblastenleukämie ist trotz identischer Therapie. Dies soll auch mit der Abb.6 demonstriert werden. Denn obwohl die meisten Patienten heute zunächst das Remissionsstadium erreichen, bei den dargestellten Patienten alle bis auf 2, sterben einige bereits wenige Monate nach Erkrankungsbeginn, meist im hämatologischen Schub, andere erst nach Jahren. Und daher haben behandelnde Ärzte immer wieder versucht, bereits bei Erkrankungsbeginn initial eine prognostische Beurteilung des Krankheitsbildes zu erreichen.

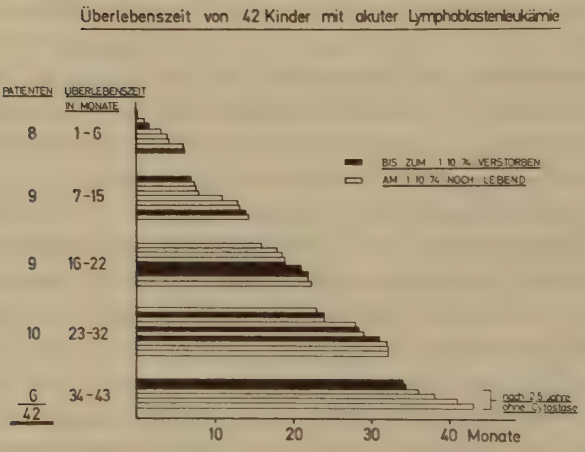

Abb.6: Bisherige Überlebenszeit von 42 Kindern mit akuter Lymphoblastenleukämie und einheitlicher Behandlung (entsprechend den Richtlinien der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung)

1. Differenzierung mittels klinischer Parameter

PIERCE et al. (1969) und PAVLOVSKY et al. (1973) fanden, daß Patienten mit einer hohen initialen Leukozytenzahl und einer ausgeprägten Organvergrößerung von Milz und Leber sowie einem Alter über 10 Jahren und unter einem Jahr - im Durchschnitt - eine schlechtere Prognose besitzen. Dieselbe Patientenpopulation soll außerdem eine erhöhte Meningiosisrate aufweisen. Ab welcher Leukozytenzahl dieses gesteigerte Risiko beginnt ist uneinheitlich und bei Leukozytenwerten zwischen 20.000 und 50.000 nicht signifikant. Insgesamt handelte es sich um 282 Fälle mit akuter Leukämie, die keiner prophylaktischen ZNS-Bestrahlung unterzogen wurden. Und bei dem Vergleich der Patienten mit Leukozyten über 50.000 und unter 10.000 ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) hinsichtlich dem Auftreten einer Meningiosis. Bei der Gruppe mit über 50.000 hatten 22 von 33 nach 24 Monaten bereits eine Meningiosis. Bei Patienten mit initial weniger als 10.000 Leukozyten dagegen nur in einer gleichen Zeitspanne 11 von 51. Zu einer Voraussage im Einzelfall ist aber diese Methode ungeeignet, schon dadurch, da 11 unserer zuletzt an der Universitätskinderklinik Erlangen behandelten 20 Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie eine initiale Leukozytenzahl im Bereich zwischen 10.000 und 50.000 hatten. Und in diesem Bereich ist eine Korrelation mit dem Auftreten einer frühzeitigen Meningiosis nicht zuverlässig. Außerdem zeigte PINKEL (1973), daß bei einem Teil der Patienten mit hoher initialer Leukozytenzahl doch eine Langzeitremission zu erzielen ist.

Auch die Beurteilung der Vergrößerung visceraler Organe als prognostisches Zeichen ist unsicher. Nach PLÜSS (1974) kann einer isolierten Hepatomegalie keine schlechtere Prognose zugeordnet werden.

2. Differenzierung mittels zytologischer und zytochemischer Parameter

LEE und Mitarbeiter beobachteten bereits 1962, daß die Blasten im May-Grünwald-Giemsa gefärbten Knochenmark eine Klassifikation ermöglichen, die sich mit prognostischen Daten (Prozentsatz an erzielten Vollremissionen, 50 % Überlebenszeit) korrelieren läßt. So wurde gefunden, daß bei vermehrten Azurgranula, größerem Zytoplasmasaum und bei einer erhöhten Anzahl und Prominenz von Nucleoli die Prognose quod vitam reduziert war. Auf etwas andere Weise versuchten MATHÉ et al. (1971) vor allem anhand der Blastengröße prognostisch unterschiedliche Krankheitsgruppen der akuten Lymphoblastenleukämie aufzuzeigen, insbesondere Krankheitsgruppen, die mehr bzw. weniger gut für eine Immuntherapie geeignet sind. Sie unterscheiden vier zytologische Subtypen der akuten Lymphoblastenleukämie: eine prolymphoblastische, eine makrolymphoblastische, eine prolymphozytische und eine mikrolymphoblastische Form, mit einer nur kurzen Überlebenszeit in der prolymphoblastischen Form und einer zunehmend besseren Prognose entsprechend unserer Aufzählung. Von BENNETT et al. (1973) wurde nachgewiesen, daß trotz gewisser Schwierigkeiten diese Differenzierung reproduzierbar ist. GAVOSTO (1973) zeigte jedoch, daß die Zellgröße sehr vom Stadium des Zellzyklus abhängig ist. So ist der Durchmesser eines Blasten in der S-Phase im Durchschnitt 12 % größer als am Beginn der G_1-Phase. Und da die Wachstumsfraktion in einer rasch proliferierenden Blastenpopulation starken Schwankungen unterworfen ist, folgt, daß beim selben Patienten die Blastengröße schwanken kann und damit kein konstantes Kriterium einer Leukämie sein kann.

Daher wurde noch durch aufwendigere Methoden wie Zytochemie und Elektronenmikroskopie versucht, eine bessere Differenzierung durchzuführen. Aus dem Arbeitskreis um MATHÉ versuchten PAINTRAND et al. (1973) durch elektronenoptische Charakteristika die vier Untergruppen zu definieren. Methodisch einfacher ist der Versuch von LAURIE (1968), durch eine Beurteilung der PAS-Reaktion

(bewertet nach der semiquantitativen Methode nach HAYHOE), prognostisch unterschiedliche Gruppen einer akuten Lymphoblastenleukämie darzustellen. Patienten mit Lymphoblasten mit einem hohen PAS-score hatten eine längere Überlebensrate als solche mit nur schwach ausgeprägter PAS-Färbung in den Blasten. Dem haben aber bereits BENNETT und HENDERSON (1969) widersprochen, denn sie untersuchten 44 Patienten und fanden keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der PAS-Reaktivität und der initialen Leukozytenzahl sowie der Zeitdauer der ersten Remission. Die unterschiedliche Beurteilung von LAURIE bzw. BENNETT mag in den unterschiedlichen Therapieschemen liegen, die von beiden benützt wurden.

Insgesamt gelang es also trotz verschiedener Versuche bisher nicht, durch Bestimmung des Differenzierungsgrades der Lymphoblasten initial bei Diagnosestellung für das leukämische Kind prognostisch relevante Aussagen zu machen.

IV. IMMUNOLOGISCHE ZELLMARKER AUF LYMPHOBLASTEN VON AKUTER LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE IM KINDESALTER

In vorläufigen Mitteilungen berichteten CATOVSKY et al. (1974) und KERSEY et al. (1974), daß ein Teil der Blasten dieser Patienten T-Zelleigenschaften tragen. Beide zeigten, daß der Krankheitsverlauf, soweit angedeutet, ungewöhnlich maligne war und oft frühzeitig eine Meningiosis auftrat. KERSEY et al. fanden jedoch, daß bis zu 60 % (von insgesamt nur (!) 15 Patienten) zu dieser Patientengruppe zu zählen sind. Dagegen berichten CATOVSKY et al. bei einer größeren Patientengruppe, daß nur 20 % T-Zelleigenschaften auf den Blasten zeigten. Der Unterschied mag sich durch die unterschiedliche Methode erklären. Daher verwendeten wir auch so viel Aufwand (dargestellt in Abschnitt II) zur Standardisierung des T-Zellmarkers. Denn

KERSEY et al. benützten als T-Zellmarker ein heterologes Antiserum, das sie herstellten, indem sie Kaninchen mit menschlichen Thymozyten immunisierten. Obwohl dieses Serum anschließend ausgiebig an B-Lymphozyten und menschlichen Erythrozyten absorbiert wurde, ist seine Spezifität unbekannt, und eventuell handelt es sich nur um den Nachweis eines natürlichen Antikörpers gegen Zellmembranbestandteile (WARNER, 1974). Während KERSEY et al. auf die weitere Klassifikation und auf den Krankheitsverlauf nicht eingingen, berichteten CATOVSKY et al., daß bei einem Patienten von 14 Jahren bereits nach 3 Monaten eine Meningiosis auftrat. Letztere Autoren versuchten auch, die Befunde mit zytochemischen Methoden in Beziehung zu setzen. Sie fanden, daß beim ersten Patienten 30 % der Blasten PAS positiv waren, beim zweiten weniger als 5 %. Bei beiden Patienten war jedoch die saure Phosphatase um über 90 % stark positiv. Irgendwelche Korrelation mit der Einteilung nach MATHÉ versuchten sie nicht, da diese Autorengruppe der Meinung ist, daß die MATHÉsche Einteilung nur mäßig reproduzierbar sei. Der ausführlich dargestellte Junge gehört mit seinem Alter (14 Jahre), mit seiner initialen hohen Leukozytenzahl (über 1 Million pro mm^3), seiner stark vergrößerten Milz auch zu der Patientengruppe, die,nach klinischen Parametern beurteilt,einem erhöhten Risiko ausgesetzt ist (Abschnitt III/1).

Mit den in Abschnitt II dargestellten Methoden wurden an 17 Kindern mit akuter Lymphoblastenleukämie im Knochenmark und peripheren Blut innerhalb 24 Stunden nach Klinikaufnahme, vor Ansetzen jeder zytostatischen oder Steroidtherapie (bei Patient Nr. 16 erfolgte die Untersuchung im frühen hämatologischen Rezidiv, vor Einsetzen der Schubbehandlung), die Blasten untersucht. Bei den Patienten Nr. 10 bis 17 wurde außerdem versucht, auf den Blasten einen Rezeptor für Komplement mittels Mäusekomplement nachzuweisen. Die Untersuchungen verliefen insgesamt negativ, daher wird an dieser Stelle darüber nicht berichtet und auf die diesbezüglichen Methoden nicht eingegangen werden.

Pat.	Blut				Knochenmark		
	Leukoz. /mm^3	Blasten (%)	T-Zellen (%)	B-Zellen (%)	Blasten (%)	T-Zellen (%)	B-Zellen (%)
B.B.	9.800	92	0,5	6,0	96,0	< 0,5	< 0,5
A.M.	14.500	68	1,5	12,5	93,5	1,0	< 0,5
K.A.	8.600	59	4,0	9,0	89,5	< 0,5	< 0,5
L.O.	167.000	81	40,5	1,5	81,0	47,0	< 0,5
H.S.	11.400	63	3,5	7,0	97,0	< 0,5	< 0,5
G.A.	6.700	76	2,0	14,5	83,5	1,5	< 0,5
F.K.	4.000	80	2,5	5,5	97,5	< 0,5	< 0,5
W.M.	15.000	91	0,5	2,0	85,0	2,0	< 0,5
S.D.	410.000	71	5,0	3,5	94,0	0,5	1,0
L.Ch.	2.400	53	14,0	10,5	98,0	4,0	1,5
S.M.	15.800	27	19,5	7,5	29,0	1,5	6,5
G.M.	8.000	66	6,5	9,5	nicht durchgeführt		
O.T.	29.100	74	11,5	2,5	96,0	< 0,5	< 0,5
S.E.	7.200	49	1,0	6,0	nicht durchgeführt		
J.M.	42.200	87	75,5	2,0	90,5	61,0	0,5
M.F.+	7.200	41	53,0	8,5	68,5	31,5	2,0
P.E.	51.500	68	12,5	8,0	88,0	2,5	1,0

+Untersuchung durchgeführt im frühen ersten hämatologischen Rezidiv

Tab. 7 a): Immunologische Zellmarker auf Blasten von Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie

Bei den Patienten L.O., J.M. und M.F. fand sich also im Knochenmark und Blut eine Blastenpopulation mit T-Zelleigenschaften (Abb.7). Damit ist der Anteil an sogenannten "T-Zell-Leukämien" bei uns wesentlich geringer als bei KERSEY et al.(1974).

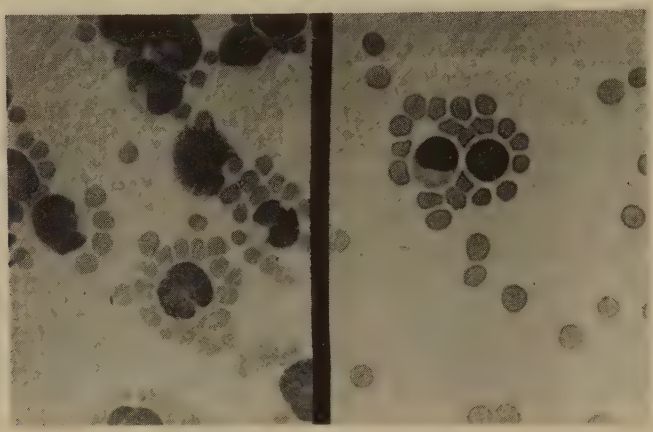

Abb.7: Re.Bildhälfte: Rosettenbildende "T-Lymphoblasten" von Pat. J.M.
Li.Bildhälfte: T-Lymphozyten einer Normalperson zum Vergleich

Übereinstimmend mit diesen Autoren und mit CATOVSKY et al. (1971) fanden wir aber auch, daß zwei Patienten initial eine hohe Leukozytenzahl besaßen und durch vermehrte Organinfiltrationen ausgezeichnet waren. Die Überlebenszeit betrug bei den Patienten nur 6 bzw. 7 Monate, im Vergleich dazu beträgt die mittlere Überlebenszeit von akuten Lymphoblastenleukämien im Kindesalter heute über 30 Monate. Bei allen Patienten kam es außerdem frühzeitig zu einer Meningiosis trotz prophylaktischer ZNS-Bestrahlung (nach mündlicher Mitteilung von Dr.Minkow, Leiter der Strahlenabteilung der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen wurde bei L.O. zum Schutz des Innenohrs ein Bleimantel

angebracht). Bei allen Patienten zeigte die Meningiosis nie eine hohe Zellzahl im Liquor (maximal 740 Zellen pro mm^3). Über den klinischen Verlauf von L.O. wurde bereits berichtet (SCHWENK, 1974b), er ist nochmals zusammenfassend in Abb. 8 festgehalten.

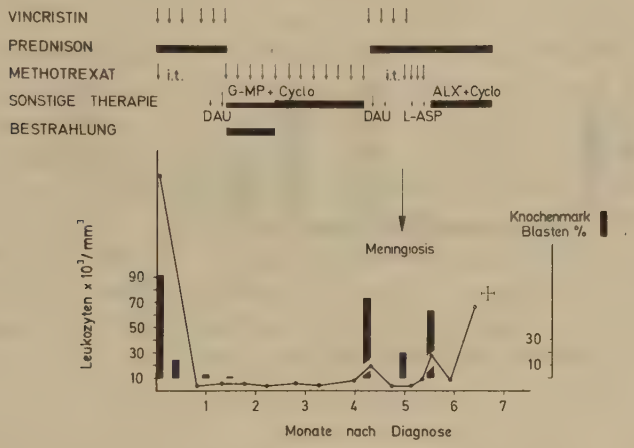

Abb. 8: Klinischer Verlauf von Pat. L.O.

J.M. (Krbl.Nr. 5c/1025/74) war ein 14jähriger Junge, der initial auf typische Weise in einem auswärtigen Krankenhaus behandelt wurde. Zur ZNS-Prophylaxe wurde er bei uns aufgenommen, diese konnte auch routinemäßig durchgeführt werden. Aber sehr früh trat das hämatologische Rezidiv auf und ab dem 4. Behandlungsmonat war er blind, ab dem 5. Behandlungsmonat wurde zum erstenmal eine Meningiosis festgestellt (Abb. 9). Bei der Obduktion war der Nervus opticus ungewöhnlich stark mit Blasten infiltriert (Sektionspräparat vom Nervus opticus wurde uns von Prof.Dr.Meythaler, Universitätsaugenklinik Erlangen, zur Verfügung gestellt).

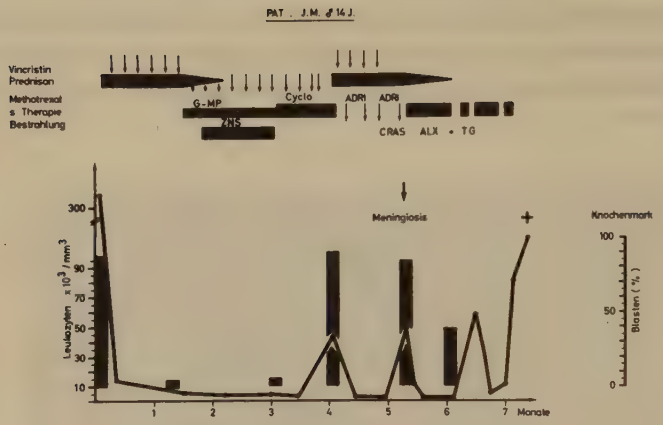

Abb. 9: Klinischer Verlauf von Pat. J.M.

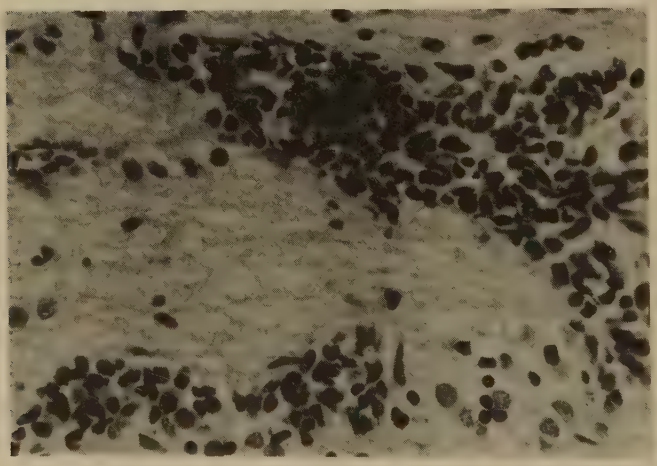

Abb.10: Blasteninfiltration im Nervus opticus von Pat. J.M.

Die zytologische, konventionelle Differenzierung der Blasten anhand des May-Grünwald-Giemsa-Präparates von zwei Patienten ergab, daß L.O. der prolymphozytischen Form der akuten Lymphoblastenleukämie (Einteilung nach MATHÉ) zuzurechnen war, J.M. dagegen der makrolymphoblastischen Form. Genauso war die PAS-Reaktion bei beiden Patienten zwar positiv, jedoch recht unterschiedlich. Bei L.O. hatten wir 268 PAS total score (semiquantitative Methode nach HAYHOE), bei J.M. 138 PAS total score. Die saure Phosphatasereaktion konnten wir leider nicht durchführen, da diese Reaktion nur an Präparaten, die weniger als 24 Stunden alt sind, vorgenommen werden kann und uns zum damaligen Zeitpunkt die Methode noch nicht zur Verfügung stand. Bei sämtlichen Rezidiven wurde sowohl im Knochenmark wie auch im Liquor cerebrospinalis gefunden, daß die Blasten erneut zu einem hohen Prozentsatz rosettenbildend waren und damit T-Zelleigenschaften zeigten. Wiederum war nur ein gewisser Teil der Blasten dazu befähigt.

Pat. L.O., ♂ , 6 1/2 J.

	Blasten(%)	T-Zellen(%)	B-Zellen(%)	Leukozytenzahl (/mm³)
Blut				
1. Rezidiv	35,0	43,5	6,5	19.000
2. Rezidiv	47,0	45,0	4,5	48.500
Knochenmark				
1. Rezidiv	61,5	52,0	< 0,5	--
2. Rezidiv	53,0	49,5	< 0,5	--
Liquor cerebrospinalis				
1. Rezidiv	98,5	54,5	< 0,5	380

Tab. 7 b): T-Zellmarker auf Lymphoblasten von Pat. L.O. bei Rezidiven in verschiedenen Zellkompartments

Erste Untersuchungen lassen uns vermuten, daß die Blasten nur in manchen Phasen des Zellzyklus den Rezeptor für Schafserythrozyten exprimieren, denn auch von anderen Autoren (BELPOMME et al., 1974) wurde gezeigt, daß die Blasten bei sogenannten "T-Zell-Leukämien" nicht hundertprozentig rosettenbildend waren.

Somit gibt diese Differenzierung eine gute Korrelation mit den klinischen Parametern, es konnte jedoch nicht gezeigt werden, daß eine Korrelation mit den zytologischen Parametern einer Leukämiedifferenzierung besteht. Da aber bekannt ist, daß die zytologischen Parameter im Verlauf einer Erkrankung wechseln können (LEDER, 1972), ist es besonders wichtig, daß unser T-Zellmarker bei Rezidiven konstant nachweisbar war. Aber erst die weitere Zukunft wird zeigen, ob durch diese Zellmarker eine Subpopulation einer akuten Lymphoblastenleukämie definiert wird, die einer besonderen Therapie bedarf. Denn in Anbetracht der unterschiedlichen Beurteilung des prognostischen Wertes einer PAS-Färbung (obwohl dieses schon seit Jahren eine klinische Routinemethode darstellt), ist zu erwarten, daß erst in einigen Jahren Endgültiges über den Wert dieser neuen Blastendifferenzierung ausgesagt werden kann, da so verschiedene Therapieschemen durchgeführt werden, und da die Standardisierung des Rosettentestes in vielen Laboratorien noch mangelhaft ist.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bei dem Jungen M.F. (Krbl.Nr. 5 c/3308/74) gemacht, der im Alter von 8 Jahren wegen rezidivierender Bauchschmerzen am 9.6.74 in einer auswärtigen Klinik appendektomiert wurde. Dabei wurde jedoch histologisch keine Appendizitis gefunden, jedoch eine ausgeprägte Lymphknotenschwellung intraabdominell beobachtet. Wenige Tage nach Operation entwickelte sich eine zunehmende Leber- und Milzvergrößerung und daher folgte die Einweisung in die Universitätskinderklinik Würzburg. Dort wurden im Blutbild bei einer Leukozytose von 24.600/mm^3 22 % PAS-positive, große, vakuolisierte Blasten gefunden. (Ein Präparat wurde uns leider davon nicht zur Verfügung gestellt und konnte nicht semi-

quantitativ ausgewertet werden.) Im Christapunktat waren dieselben Blasten in über 90 % nachweisbar. Nach typischer Initialbehandlung mit sechs Injektionen Vincristin (à 1,6 mg) erfolgte nach Remissionsinduktion die Verlegung zu uns. Bei uns wurde zunächst die prophylaktische ZNS-Bestrahlung begonnen. Der Junge klagte aber immer wieder über Bauchschmerzen,und im rechten Unterbauch konnte zunächst ein tennisball-großer Tumor getastet werden. Die Inappetenz nahm zu, es kam zu mehrmaligem Erbrechen. Am 28.8. zeigte die Magen-Darm-Passage das eindeutige Bild einer Invagination im Ileozoekalbereich. Die durchgeführte Laparatomie bestätigte die Diagnose Invagination, außerdem fand man mehrere hühnereigroße Tumoren im Bereich der Valvula Bauhini. Die mikroskopische Untersuchung durch Professor Dr. K. Lennert (Lymphom-Programm) ergab"völlig infiltriertes Lymphknotengewebe mit atypischen Zellen. Diese sind relativ groß, nämlich etwa doppelt bis dreifach so groß wie Lymphozyten. Man sieht massenhaft Mitosen. Es sind in den Lymphknoten so ausgedehnte Infiltrate vorhanden, daß man nirgends mehr regelhaftes Lymphknotengewebe findet. In den Ausstrichpräparaten sieht man entsprechende Zellen. Ein Versuch,Chlor-acetat-Esterase-positive Zellen in den Schnitten zu finden, fällt negativ aus". Von dem Tumormaterial wurde durch mechanische Zellvereinzelung eine Zellsuspension hergestellt (Methode bei SCHWENK et al., 1970). Die Blasten zeigten in 69,5 % T-Zelleigenschaften. Membranimmunfluoreszierende Zellen wurden unter Verwendung eines polyvalenten Antiserums nur in 2,5 % gefunden. Die massenhaft beobachteten Mitosen im histologischen Schnitt (Prof. Dr.Lennert)sind wiederum ein Hinweis, daß der unterschiedliche Charakter dieser Leukämieform auf einem spezifischen Proliferationsverhalten der Blasten beruhen mag.

Obwohl die Bauchtumoren zum größten Teil bei der Operation entfernt wurden, wurden bereits wieder 6 Wochen nach der Operation im ehemaligen Tumorbett erneute Resistenzen getastet, die rasch an Größe zunahmen. Daher wurde versucht, durch eine Intensivierung der Zytostase diese Tumorbildung zu beeinflussen. Unter dieser

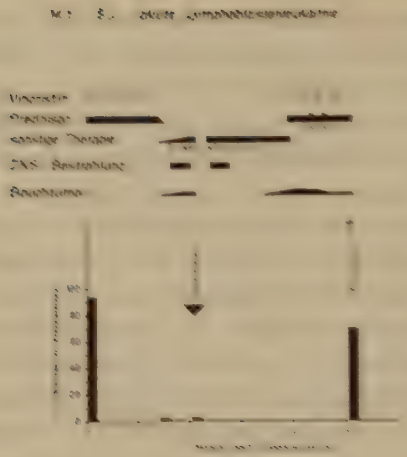

Abb. 11: Klinischer Verlauf von Pat. M.F.

Therapie entwickelte sich aber das hämatologische Rezidiv, dem der Junge erlag. Postmortal waren noch 51,5 % der Blasten T-zell-rosettenbildend.

Der Krankheitsverlauf (Abb. 11) war wiederum gekennzeichnet durch seine Resistenz gegenüber hochdosierter Zytostase und den Nachweis von Lymphoblasten mit T-Zelleigenschaften in verschiedenen Kompartments. Außerdem wurde postmortal zwei Monate nach Bestrahlungsende wiederum eine Meningiosis diagnostiziert (die Blasten konnten in diesem Kompartment nicht auf Zellmarker untersucht werden). Es handelte sich um eine PAS positive Lymphoblastenleukämie mit Tumorbildung bereits vor dem hämatologischen Rezidiv.

Der Krankheitsverlauf zeigt, daß die bisherige strenge Trennung in malignes Lymphom (Lymphosarkom) einerseits und in Lympho-

blastenleukämie andererseits willkürlich ist. Aus Nomenklaturgründen erscheint es am besten, die Krankheit entsprechend der Erstsymptomatik zu bezeichnen, d.h. malignes Lymphom mit leukämischer Transformation oder akute Lymphoblastenleukämie mit Tumorbildung. Die Diskussion, ob es sich bei einem Krankheitsbild um die Frühgeneralisation eines kindlichen malignen Lymphoms oder eine primäre Lymphoblastenleukämie handelt, ist dagegen fruchtlos. Daher wird im nächsten Abschnitt über dieselben Untersuchungen bei malignen Lymphomen berichtet.

Die Therapie dieser besonderen Form der Lymphoblastenleukämie ist noch sehr unbefriedigend. Eine Therapieintensivierung durch Erweiterung der Kombinationszytostase scheint keine besseren Resultate zu erzielen (PLÜSS, 1974). Aber auch die Immuntherapie in der bisherigen Form (MATHÉ, 1970), die wahrscheinlich gestattet, die Zytostatikagesamtdosis bei manchen Lymphoblastenleukämien zu reduzieren, ist für diese spezielle Krankheitsgruppe ungeeignet. Vor der Anwendung neuer Therapiekonzepte in randomisierten Studien ist die prognostische Relevanz des beschriebenen Zellmarkers weiter zu erhärten (vgl. Abschnitt III/1).

V. IMMUNOLOGISCHE ZELLMARKER AUF BLASTEN VON LEUKÄMISCH-TRANSFORMIERTEN MALIGNEN LYMPHOMEN IM KINDESALTER

Die Abtrennung der kindlichen malignen Lymphome (nicht Hodgkin Lymphome) von den Leukämien ist zum Teil willkürlich (LENNERT, 1974). So zeigen auch zum Beispiel neueste Tierexperimente, daß in Primaten mit einer Viruspräparation einmal ein Lymphom, dann eine Leukämie zu induzieren ist. Die Klassifikation dieser Krankheitsgruppe erfährt heute eine wesentliche Änderung. Denn die von RAPPAPORT (1965) inaugurierte Einteilung, obwohl sie bei der Beurteilung von Lymphomen Erwachsener eine Bedeutung erlangt hat,

ist für die Bewertung kindlicher Lymphome ungeeignet, da die Gruppe der nodulären und gut differenzierten Lymphome im Kindesalter nicht beobachtet wurde. Außerdem zeigten neuere Untersuchungen, daß bei dieser Einteilung große Lymphoidzellen für Histiozyten gehalten wurden, und der Ausdruck undifferenzierte und ausdifferenzierte Lymphoidzellen kann heute besser definiert werden. So wird derzeit eine neue Klassifikation versucht, die stark beeinflußt wird von einer immunologischen Lymphozytendifferenzierung. Dabei wurden bisher aber nur bei Erwachsenen die Blutlymphozyten intensiv untersucht. Und die Untersuchungen von BLOCH und AISENBERG (1972) sowie PIESSENS et al. (1973) zeigten, daß diese Zellen bis zu 80 % B-Zelleigenschaften besitzen. Zudem weisen PIESSENS et al. darauf hin, daß die Prognose bei Patienten ohne erhöhte B-Zellpopulation bei den peripheren Lymphozyten prognostisch günstiger ist. Und genau dies wird von Klinikern von einer guten Einteilung dieser Lymphome durch den Pathologen gefordert: prognostische Aussagen, Anleitungen zum differenzierten therapeutischen Vorgehen. Während im Blut die Zellen gehäuft auf Zellmarker untersucht wurden (WYBRAN et al., 1972, HUBER et al., 1974) liegen noch kaum Untersuchungen vor, die am Tumorgewebe vorgenommen wurden. Insbesondere sind kaum Untersuchungen über kindliche Lymphome bekannt. Die wenigen bisher bekannten Resultate bei Erwachsenen sind bereits von großer Bedeutung: So konnten JAFFÉ et al. (1974) zeigen, daß beim nodulären Lymphom die Lymphoidzellen den B-Zellrezeptor für Komplement tragen. Durch Untersuchungen an Sektionsschnitten wurde wahrscheinlich gemacht, daß diese Lymphomzellen sich aus dem Lymphfollikel entwickeln, denn nur diese Zellen des Lymphknotens tragen diesen Zellmarker. Entsprechend weist LENNERT (1974b) darauf hin, daß die "Haarzell-Leukämie" im Cortex, das Sézary-Syndrom hingegen im paracortalen Bereich initiiert ist. Unsere Untersuchung wurde an zwei Patienten durchgeführt:

B.M., geb. 14.6.1970, wurde erstmals mit 3 1/2 Jahren hier aufgenommen wegen Verdachts eines Herzfehlers (Krbl.Nr. 5 c/2556/73), da die Eltern seit 4 Wochen Atembeschwerden des Kindes beim Trep-

pensteigen beobachteten. Die Thoraxaufnahme ergab einen riesigen Mediastinaltumor. Die Leber war 2 cm, die Milz 1 cm unter dem Rippenbogen tastbar. In der linken Axilla fand sich ein bohnengroßer Lymphknoten.

Die Biopsie dieses Knotens wurde von Prof.Dr.Hermanek, Abteilung für klinische Pathologie an der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen, befundet:"Die Struktur des Lymphknotens ist stellenweise verwaschen bzw. aufgehoben. Hier findet sich eine auf das perinoduläre Gewebe übergreifende diffuse lymphoidzellige Infiltration. Dabei ist die Zellpopulation einheitlich, vorwiegend atypische mittelgroße lymphozytäre Elemente, z.T. mit Mitosen, z.T. mit mäßig ausgeprägter Kernpolymorphie. Zusammenfassung: Lymphosarkom." Die immunologische Untersuchung der Tumorzellen auf Zellmarker ist aus Tabelle 9 zu entnehmen, es fanden sich zudem keine Rezeptoren für Komplementkomponenten auf diesen Zellen. Der klinische Verlauf der Patientin war trotz intensivster zytostatischer Therapie und Bestrahlung des Mediastinums ungewöhnlich maligne.

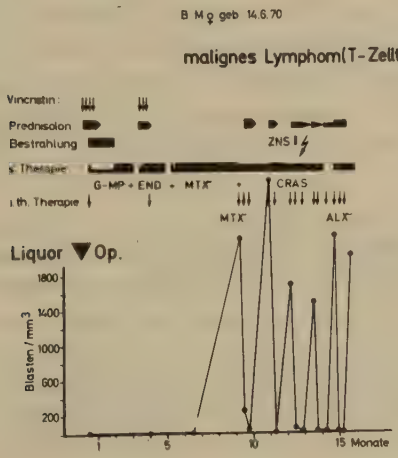

Abb. 12: Klinischer Verlauf von Pat. B.M.

Bereits 8 Monate nach Diagnosestellung trat eine erste Meningiosis auf. Und zu diesem Zeitpunkt und bei den rezidivierenden Meningiosen wurden die Blasten wiederum auf ihre immunologischen Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, daß ein hoher Prozentsatz der Blasten (s.Tab.8) rosettenbildend ist, dagegen keine Membranfluoreszenz mit Anti-Immunglobulinseren nachweisbar war (ebenso wenig ein Rezeptor für Komplement). Unter der Therapie nahm der Anteil an Blasten (s.Tab.8) mit T-Zelleigenschaften ab. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Einmal kann dies einen starken Rückgang der malignen Zellpopulation demonstrieren, so daß mononucleäre Reizformen für Blasten gehalten werden. Zum anderen kann eine Änderung der Blastenoberfläche durch die Zytostase zu einem Zellmarkerverlust führen (Zellzyklusabhängigkeit des Zellmarkers?).

Dat.	Meningiosis Nr.	Mononucleäre Zellen im Liquor/mm^3	Blasten (%)	T-Zelleigenschaften (%)	Therapie
6.4.74		2240	98,5	59	
10.4.	I	240	91,0	21	Methotrexat intrathekal
15.4.		4	77,5	12	
26.6.		1700	97,0	63	
3.7.	III	17	89,5	32	Cytosin-arabinosid
8.7.		7	86,0	18	intrathekal

Tab.8: Lymphoblasten mit T-Zelleigenschaften im Liquor cerebrospinalis von Pat. B.M. nach wiederholter intrathekaler Zytostatikaapplikation

Am 11.7.1974 wurde an Prof.Dr.Lennert, Kiel, eine Zytozentrifugenpräparation zur sauren Phosphatasefärbung gesandt. Er schreibt: "Wir haben daran die saure Phosphatasereaktion durch-

geführt. Sie ist hochtypisch. Sie können absolut sicher sein, daß es sich hier um einen Thymustyp (convoluted type) des Lymphoblastensarkoms handelt. Eine andere Möglichkeit existiert zytochemisch nicht. Die PAS-Reaktion ist im übrigen negativ."

In Übereinstimmung mit den T-Zell-Leukämien" ergab sich, daß in den Blasten saure Phosphatase nachweisbar war. Die PAS-Färbung scheint dagegen nicht einheitlich zu sein, da unsere Patienten mit "T-Zell-Leukämien" PAS-positiv waren, genauso wie bei CATOVSKY et al. (1974).

Diese malignen Lymphome des vorderen Mediastinums wurden bereits von STERNBERG 1916 beschrieben. Es handelte sich dabei um Jungen, die sehr bald an der Erkrankung ad exitum kamen. Ob dies auch für die heutige Therapie zutrifft, ist noch nicht geklärt. B.M. lebt jetzt genau ein Jahr seit Diagnosestellung. Der klinische Verlauf ist nur der Mitteilung von STATHOPOULOS et al. (1974) zu entnehmen, da SMITH et al. (1973) den Krankheitsverlauf ihres Patienten nicht mitteilen konnten. Die Überlebenszeit betrug bei ihnen nur 6 bzw. 10 Monate. Bei einem entwickelte sich ebenfalls ein ZNS-Befall. Über die Therapie, vor allem ob eine prophylaktische ZNS-Bestrahlung durchgeführt wurde, wurde leider nichts ausgesagt. STATHOPOULOS et al.(1974) fanden zudem, daß ein morphologisch identischer Tumor auf den Blasten B-Zelleigenschaften trug.

Zusammenfassend handelt es sich um einen Tumor,der wohl bei Jungen und Mädchen vorkommt, der in der Regel sehr maligne verläuft und bei dem frühzeitig eine Meningiosis auftritt. Dieser Lymphomtyp (convoluted type nach LUKES) kann erfaßt werden durch seine T-Zellcharakteristika und durch die Färbung mit saurer Phosphatase. Ob diesem Tumortyp auch ein charakteristischer Verlauf

korreliert ist, muß an weiteren Beobachtungen geklärt werden, wobei die unterschiedlichen Therapieformen berücksichtigt werden müssen.

Diesem Krankheitsbild soll der Verlauf eines anderen Patienten gegenübergestellt werden, dessen Blasten ebenfalls auf Zellmarker untersucht wurden:

G.J., geb. 5.1.1958, Krbl.Nr. 5 c/1594/71.
Der 13jährige Junge bemerkte Ende 1970 eine Schwellung in der rechten Leiste, die Biopsie ergab ebenfalls die Diagnose Lymphosarkom (Prof.Dr.Müller, Pathologisches Institut der Universität Erlangen). Zunächst wurde in größeren Abständen das Tumorbett bestrahlt, da immer wieder strahleninduzierte Leukopenien auftraten. Die Gesamtdosis betrug 4500 R. Seit Mitte 1971 erfolgte eine zytostatische Therapie entsprechend den derzeitig von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung empfohlenen Richtlinien, die im Sommer 1972 für etwa einen Monat ausgesetzt werden mußte wegen einer schweren, therapiebedingten Knochenmarksdepression. Im September 1973 wurde die zytostatische Therapie nach eingehender Kontrolluntersuchung (Liquor und Knochenmark blastenfrei), knapp 2 1/2 Jahre nach Behandlungsbeginn, abgesetzt.

In den Weihnachtsferien 1973 klagte J. zum erstenmal über Sehstörungen. Ende Januar 1974 diagnostizierten wir eine Meningiosis und gleichzeitig die leukämische Transformation des Lymphosarkoms.

Mit einer typischen, verstärkten Rezidivbehandlung (s.Abb.13) gelang es rasch, J. wieder in Remission zu bringen. Seither (7 Monate) ist er in Remission seiner Erkrankung, insbesondere ist bisher keine neue Meningiosis aufgetreten.

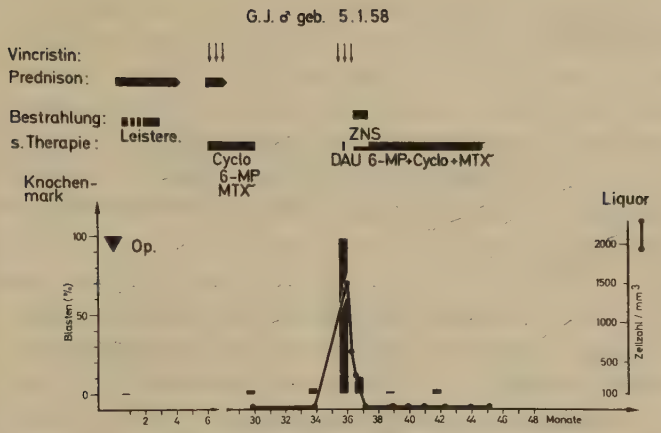

Abb.13: Klinischer Verlauf von Pat. G.J.

Aus Tabelle 9 ist zu entnehmen, daß die Blasten weder im Knochenmark noch im peripheren Blut T- oder B-Zelleigenschaften zeigen. Der Krankheitsverlauf kontrastiert in seiner relativen Benignität mit dem von M.B. Das Rezidiv (nach 3 Jahren) zeigt, daß dieser gutartige Verlauf nicht durch eine Frühoperation erzielt wurde. Nach dem Hirnszintigramm zu urteilen, ist die Meningiosis auch noch floride, obwohl sie keine klinische Symptomatik macht. Unsere immunologische Differenzierung soll beitragen, bereits bei Diagnosestellung eine therapeutisch bedeutsame Unterscheidung dieser malignen Lymphome, deren histologischer Befund fast identisch lautet, zu erhalten. Und unsere wenigen Patienten scheinen anzuzeigen, daß der Krankheitsverlauf maligner und prognostisch ungünstiger ist, wenn die Blasten - bei der akuten Lymphoblastenleukämie und bei den malignen Lymphomen - T-Zelleigenschaften exprimieren. So ist es naheliegend, aufgrund dieser Beobachtungen und der von den

Patient G.J., 15 Jahre

	Zellzahl /mm^3	Blasten (%)	T-Zellen (%)	B-Zellen (%)
Tumorgewebe konnte nicht untersucht werden				
Blut beim 1. Schub	9400	82	1	3,5
Knochenmark beim 1. Schub		98	< 0,5	0,5
Liquor bei 1. Meningiosis	1500	99,5	< 0,5	0,5

Patient M.B., 3 Jahre

	Zellzahl /mm^3	Blasten (%)	T-Zellen (%)	B-Zellen (%)
Tumor		94,5	63	7,5
Blut beim 1. Schub	1400	3	55,5	31
Knochenmark beim 1.Schub		89	59,5	4,5
Liquor bei 1. Meningiosis	2240	94	66	1

Tab.9: Immunologische Zellmarker auf Blasten von 2 Patienten mit malignem Lymphom und leukämischer Transformation

zitierten Autoren,bei Lymphomen vom T-Zelltyp bereits in einer Frühphase die ZNS-Bestrahlungsprophylaxe durchzuführen. Bei zukünftigen kontrollierten Studien über die Wirksamkeit von Chemotherapeutika (bzw. einer Immuntherapie) sollten diese Zellmarker mit den anderen aufgeführten, prognostisch relevanten Parametern dokumentiert werden um auszuschließen, daß überdurchschnittlich gute Behandlungsresultate nicht nur auf einer Selektion des Patientengutes beruhen.

Nicht geeignet ist diese immunologische Blastendifferenzierung aber für eine Unterscheidung einer akuten Lymphoblastenleukämie von einem frühgeneralisierten Lymphosarkom, da bei beiden Erkrankungen Blasten ohne Zellmarker nachweisbar waren. Daß dieser Frage keine Bedeutung zukommt, wurde bereits im Abschnitt IV dargelegt.

Warum diese "T-Zell-Leukämie" und Lymphomform jedoch schwerer verläuft und häufiger zu ZNS-Erkrankungen führt,ist noch völlig unklar. Eigene abgeschlossene Untersuchungen wurden hierzu nicht angestellt. Verschiedene Hypothesen sind möglich:

1. Der neoplastisch transformierte T-Zellklon ist nicht mehr fähig, wichtige physiologische Aufgaben der Tumorinhibition wahrzunehmen. Dafür sprechen die Untersuchungen von MELIEF et al. (1974). Sie fanden bei T-Zell-Leukämien eine reduzierte PHA-Stimulation, d.h. die Funktion dieser transformierten Zellen war stark eingeschränkt. Genau wie bei der chronischen Lymphadenose die leukämischen Zellen nicht mehr durch ein B-Zellmitogen stimuliert werden konnten (DAGUILLARD et al.,1974). Ob diese T-Zellen aber durch eine höhere PHA-Konzentration nicht doch stimuliert werden, ist noch nicht ausgeschlossen, da verschiedene Dosen an PHA nicht untersucht wurden. Aber auch andere, nicht-immunologische Mechanismen müssen diskutiert werden. So vermuten wir, aufgrund erster Untersuchungsergebnisse an der in

Kultur gehaltenen T-Zell-Linie, daß das unterschiedliche Proliferationsverhalten dieser Leukämieform für den erhöhten Malignitätsgrad (und die Progredienz) verantwortlich ist.

2. Warum eine "T-Zell-Leukämie" früher und öfters zu einer Meningiosis führt, bleibt ungeklärt. Man mag vermuten, daß dies auf der Antigenverwandtschaft eines Oberflächenantigens von T-Zellen mit einem Hirnzellantigen beruht, wie es von BROWN und GREAVES (1974) beschrieben wurde. Dadurch würden diese T-Lymphoblasten im Gehirn sich in einer "immunologisch privilegierten Stelle" befinden und könnten durch regulatorische Autoantikörper, denen auch neoplastische Zellen unterworfen sind (GRABAR) nicht mehr kontrolliert werden. Zu dieser Hypothese sind viele Vorbehalte zu machen, denn es kommt weniger zu einer Hirninfiltration als zu einer Infiltration entlang der Gefäße der Arachnoidea. Zum anderen ist die Pathogenese der Meningiosis leucaemica noch völlig ungeklärt. Denn es ist noch nicht entschieden, ob diese Blasten sich - in situ - aus einer totipotenten Mesenchymzelle entwickeln, wie von AMROMIN (1968) vermutet wurde oder aber, wie von THOMAS (1965) für die Mäuseleukämie L 1210 nachgewiesen, auf einer Einwanderung der Blasten in dieses Kompartment berunten.

Den Ausdruck "T-Zell-Leukämie" benützen wir - der Kürze wegen - nur mit Anführungszeichen, da der alleinige Nachweis dieses Zellmarkers noch nicht beweist, daß diese Zellproliferation wirklich von T-Lymphozyten ausgeht. Im Gegensatz zu CATOVSKY et al., die in ihrer vorläufigen Mitteilung die Bezeichnung T-lymphoblastic leukemia gebrauchten, halten wir es für zutreffender, diese Form als Lymphoblastenleukämie mit T-Zelleigenschaften zu bezeichnen. Ebenso wenig erwiesen ist, daß diese Leukämieform im Thymus initiiert wird, so hatten auch alle drei unserer derartigen Leukämiepatienten während des gesamten Krankheitsverlaufes nie eine Mediastinalverbreiterung (Thymusvergrößerung).

VI. LYMPHOZYTENVERTEILUNG BEI PATIENTEN IN ERSTER REMISSION EINER AKUTEN LYMPHOBLASTENLEUKÄMIE WÄHREND DER KOMBINATIONSZYTOSTASE

Seit Jahren werden immunologische Parameter bei Malignompatienten untersucht, um so einen Einblick zu gewinnen in die komplexen Zusammenhänge zwischen Neoplasie, Immunstatus und zytostatischer Therapie. Dabei wurde, vor allem durch die Arbeit von HERSH und von AISENBERG gefunden:

1. Immunologische Defekte bei diesen Patienten sind - in der Regel - eine Folge des Malignoms und gehen der Ausdehnung der Geschwulst parallel. Selten geht die Immundefizienz der Malignomausbreitung voraus. So leiden Patienten mit Immunmangelkrankheiten an einem erhöhten Malignomrisiko. Dies ist schon länger bekannt für das Wiskott-Aldrich-Syndrom und die Ataxia teleangiectatica. Im Durchschnitt errechnete KERSEY et al. (1974) für alle Immunmangelkrankheiten eine Erkrankungshäufigkeit an Malignomen, die etwa 100 mal über dem Erwartungswert der Allgemeinbevölkerung liegt. 75 % dieser Malignome bestehen wiederum aus lymphoretikulären Geschwülsten. Ungeklärt ist noch immer der pathogenetische Mechanismus, der dafür verantwortlich ist, und so werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Welcher physiologischen Bedeutung dabei die "immunological surveillance" (THOMAS, 1959, BURNET, 1970) für die Verhinderung der Entwicklung eines manifesten Malignoms zukommt, bleibt daher noch unklar (Übersicht bei GLEICHMANN, 1973).

2. Obwohl unsere zytostatische Therapie zum Teil immunsuppressiv ist, findet sich bei der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenen eine Korrelation zwischen Immunstatus und Prognose (GUTTERMANN et al.,1972). So erreichen Patienten, die von einer "Immuninkompetenz" zu einer "Immunkompetenz" - trotz Zytostase - überwechseln, das Remissionsstadium. Während hingegen bei Patienten, die mit einer Verschlechterung des

Immunstatus auf die Zytostase reagieren, eine Remission nicht erzielt werden kann. Dabei ist aber immer noch nicht geklärt, ob die Änderung des Immunstatus kausal für die erzielte Remission verantwortlich ist oder nur ein Epiphänomen darstellt.

3. Das Ausmaß der therapeutisch bedingten Immunsuppression durch Radiatio und Zytostase ist abhängig von der Grundkrankheit, der Dosierung der Therapeutika und der Methodik der immunologischen Diagnostik und unterscheidet sich stark bei den verschiedenen Autoren (z.B. BORELLA und WEBSTER, 1971, WAHLEN et al., 1974). Daher sollen die bisher erhobenen Befunde nur bezüglich der akuten Lymphoblastenleukämie diskutiert werden:

Zur Prüfung der humoralen Immunität wurde die Immunantwort auf Mumps- und Influenzaantigene, Hämocyanin und verschiedene bakterielle Antigene untersucht. Durch Zytostase und Radiotherapie war die Primärantwort meist reduziert, die Sekundärantwort kaum zu beeinflussen. Das T-Zellsystem wurde geprüft durch Hauttestung mit verschiedenen mikrobiellen Antigenen, z.T. durch Sensibilisierung mit 2,4 Dinitrochlorbenzol und durch Stimulierung der Lymphozyten mit Phytohämagglutinin und anderen Mitogenen. Dabei konnte wegen der Leukopenie der Einbau von Thymidin (DNS-Synthese) in kulturgehaltenen Lymphozyten meist nur mit einer PHA (Phytohämagglutinin)-Dosis geprüft werden. Eine Dosiswirkungskurve wurde nur selten durchgeführt. Die Kulturen werden auf eine konstante Zellkonzentration eingestellt und geben dabei die "in-vivo-Lymphopenie" nicht mehr wieder. So wurde auch meist bei intensiver Therapie (BORELLA und WEBSTER, 1971) eine normale Lymphozytenstimulation trotz Chemotherapie und Radiotherapie gefunden. Wie wichtig methodische Einzelheiten sind, zeigen aber die Untersuchungen von WAHLEN et al. (1974), die trotz fast identischer Therapie bei 8 von 10 Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie eine re-

duzierte PHA-Stimulation fanden. (Diese normalisierte sich nur, wenn schwerwiegende Infektionen auftraten.) Außerdem gibt es einige weitere Vorbehalte, die PHA-Stimulation als ein "in-vitro-Parameter" der T-Zellfunktion zu werten:

1. In einem B-T-Zellgemisch sind auch B-Zellen zumindest in einem Prozentsatz durch PHA transformierbar (PHILLIPS und ROITT, 1973, GREAVES et al. 1974).

2. Die bisher benützten Methoden zur Lymphozytenisolierung mit Nylonwatte reichern T-Zellen an (BROWN und GREAVES, 1974).

3. Eine unterschiedliche Kontamination mit Makrophagen verändert die PHA-Stimulierbarkeit (LEVIS et al., 1969).

4. Zahlreiche Serumproteine zeigen eine Hemmwirkung auf die Lymphozyten-Transformation (Übersicht bei JOHANNSEN et al., 1974).

Trotz dieser Mängel wurde die Methode sehr häufig benützt, eine absolute Bestimmung der T-Lymphozyten im Blut unter immunsuppressiver Therapie dagegen noch kaum durchgeführt. Zum erstenmal versuchten dies STJERNSWÄRD et al. (1972). Diese Autoren untersuchten Patienten, die wegen eines Mammakarzinoms bestrahlt wurden und fanden mittels des spontanen Rosettentests eine absolute und relative T-Lymphozytenverminderung im peripheren Blut. Nach den Untersuchungen von WYBRAN et al. (1973) bei der chronischen Lymphadenose gibt es bisher keinen Anhalt dafür, daß sich auch die Funktion der bereits reduzierten T-Lymphozyten unter der Therapie verändert. Diese etwaige therapiebedingte Funktionsstörung der T-Lymphozyten kann nur geklärt werden, wenn zunächst diese Zellen reinst isoliert werden. Und wird dann eine Verminderung der PHA-Stimulierbarkeit nachgewiesen, kann eine gestörte Funktion vermutet werden. Solche Untersuchungen liegen bisher nicht vor.

Daher ist es - nach unserer Ansicht - zunächst besser, die T-Lymphozyten nur zu quantifizieren, als an einem undefinierten Zellgemisch eine Stimulation durchzuführen.

Die kutane Sensibilisierung (z.B. mit 2,4-Dinitrochlorbenzol) oder die Hauttestung mit bakteriellen, mykotischen oder viralen Antigenen halten wir für die zum Teil schwerkranken Kinder zu belastend. Daher haben wir auf diese Untersuchungen bewußt verzichtet.

Immunologische Verlaufskontrollen sind aus folgenden theoretischen und klinisch praktischen Belangen wichtig:

1. Früherkennung einer Phase erhöhter Infektionsgefahr
2. Unterteilung der Patientenkollektive in prognostisch unterschiedliche Gruppen
3. Therapiesteuerung
4. Schonung der tumorimmunologisch wichtigen Lymphozytensubpopulationen während der Therapie

Zu 1.:
Wie HERSH et al. sowie VIOLA bereits 1965 zeigen konnten, sind die unmittelbaren Haupttodesursachen von Leukämiepatienten seit Jahrzehnten schwere, vor allem gramnegative Infektionen. Und es ist nicht verwunderlich, daß bei den leukopenischen, sich im hämatologischen Schub befindlichen Patienten, die zudem oft diffus aus Schleimhautulcera bluten, die Infektresistenz stark herabgesetzt ist. Erstaunlich ist aber, daß auch Kinder in hämatologischer Vollremission und ohne extreme Leukopenie nur aufgrund der über Monate und Jahre angewendeten Kombinationszytostase an schweren Infektionen lebensgefährlich erkranken können. Als erster haben SIMONE et al. (1972) gezeigt, daß in einer spezialisierten Tumorklinik (St.Jude Children's Research Hospital, Memphis) 16 % (von 202) der Kinder mit akuter Lymphoblastenleukämie im Remissionsstadium an Infektionen verstarben.

Diese Todesfälle waren nicht durch bakterielle Infektionen bedingt, sondern in der Regel durch die therapeutisch viel schwerer angehbaren Pilz-, Protozoen- oder Virusinfektionen. Mit einer weiteren Therapieintensivierung werden diese tragischen Zwischenfälle, die Todesfälle beruhen ja direkt auf unserer Therapie, weiter zunehmen. Denn in derselben Arbeit berichten SIMONE et al., daß vor 1966, als dort noch nicht diese höher dosierte zytostatische Therapie durchgeführt wurde, noch kein Kind in der hämatologischen Vollremission verstarb. Daher ist unerläßlich, daß Phasen erhöhter Infektionsgefahr rechtzeitig erkannt werden. Die immunologischen Verlaufsuntersuchungen prüfen jedoch nur einen ganz kleinen Teil der komplexen Infektabwehrmechanismen (Übersicht bei SCHWENK und TRUCKENBRODT). Denn außerdem sind noch zahlreiche - außerimmunologische - Parameter und Wirtsfaktoren für das Angehen und das Ausmaß einer Infektion verantwortlich. Die Objektivierung dieser zusätzlichen Parameter ist zum Teil schwierig oder für die Kinder zu belastend oder gar gefährlich (wie die Hautfensterung nach REBUCK). Daher stellt die regelmäßige Kontrolle der Blutleukozyten mit regelmäßigen Bestimmungen der Immunglobuline die heute vorgeschriebene Richtlinie der Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung dar und ist als eine Minimalforderung zu betrachten. Diese Arbeitsgemeinschaft empfiehlt, die Therapiesteuerung anhand der Leukozytenwerte durchzuführen. Dabei bleibt die große Schwankung der Lymphozytenwerte unberücksichtigt. Wir wissen aber heute, daß ganz bestimmte Lymphozytensubpopulationen für die Überwindung dieser Protozoen-, Pilz- und Virusinfektion verantwortlich sind. Denn dieselben Erreger werden seit Jahren bei den schweren Infektionen von Patienten mit Immundefekten und gestörter T-Zellentwicklung gefunden. So erkranken Säuglinge mit di George-Syndrom, Thymushypoplasien schon in den ersten Lebensmonaten mit oft schweren Pneumonien, die durch Protozoen (Pneumocystis carinii), Candida albicans oder das Cytomegalievirus bedingt sind. Daher ist zu erwarten, daß während dieser Therapiephase vor allem die T-Lymphozyten durch die Zytostatika vermindert oder in ihrer Funktion geschädigt werden.

Wir haben seit 1971 drei Kinder an den Folgen einer Varizelleninfektion (Pneumonie) verloren. Wiederholt beobachteten wir das Auftreten eines Herpes zoster bei Leukämiepatienten, der einmal generalisierte, aber insgesamt immer komplikationslos abheilte. Im selben Zeitraum verloren wir 2 Kinder an der Folge einer interstitiellen Pneumonie. In der Literatur wird über eine Mortalität bis 47 % berichtet (JOHNSON und JOHNSON, 1970). Bei unserer wesentlich niedrigeren Mortalität muß berücksichtigt werden, daß wir auf einen Erregernachweis durch Lungenpunktion verzichten und die Diagnose nur anhand der Röntgenaufnahme und der klinischen Symptomatik stellen.

Zu 2.:
Wie bereits erwähnt, konnten GUTTERMANN et al. (1972) zeigen, daß aus dem Verhalten des Immunstatus eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie prognostische Rückschlüsse gezogen werden können. Ähnliches versuchten BORELLA et al. (1972) bei der akuten Lymphoblastenleukämie: Sie untersuchten nach Absetzen der Zytostase (2 1/2 bis 3 Jahre nach Therapiebeginn), ob das Ausmaß des "Rebound-Phänomens", d.h. die überschießende Immunreaktion mit der anschließenden Remissionsdauer korrelierbar ist. In der kurzen Beobachtungsdauer und da nur wenige Kinder nach Absetzen der Therapie 3 Jahre nach 1. Remission ein Rezidiv erlitten, konnte kein eindeutiges Resultat diesbezüglich gewonnen werden. Da dieselbe Arbeitsgruppe (SEN und BORELLA, 1973) bisher als einzige Untersuchungen mit immunologischen Zellmarkern im Remissionsstadium, und zwar nach Therapieende durchgeführt hat, ergänzen sie unsere Untersuchungen und sollen kurz diskutiert werden. Sie fanden: Die B-Lymphozyten (nachgewiesen ebenfalls in einer direkten Membranimmunfluoreszenztechnik) stiegen innerhalb 2 - 3 Monate nach Absetzen der Therapie auf über 20 % an (Normalwerte dieser Autoren für gesunde Erwachsene nur 11 $\pm$ 1,1 %). Entsprechend nahmen die rosettenbildenden T-Lymphozyten in den ersten Monaten nach Therapieabbruch ab, um dann langsam anzusteigen und erst nach rund

einem Jahr hatten sie den Normalbereich wiederum erreicht. Erfreulicherweise wurde in keinem Fall ein Jahr nach Therapieende noch irgendwelche Störung der Immunregulation gefunden. Damit ist aber nicht beantwortet, ob die zytostatische Therapie nicht doch für die Initiation von Zweittumoren, wie es für das Cyclophosphamid im Tierreich bereits erwiesen ist, kausal verantwortlich gemacht werden kann. Diese Frage ist besonders dringend zu beantworten für "geheilte Leukämiekinder", da bei diesen auch bei einer jahrzehntelangen Latenzzeit bis zur Tumorentstehung diese noch erlebt wird. Mit Sicherheit kann diese Frage erst in mehreren Jahrzehnten durch eine eingehende Statistik und Kasuistik beantwortet werden. Die experimentelle Onkologie kann hierzu nur Modellvorstellungen aufzeigen. Einzelne, nicht statistisch gesicherte, klinische Fallbeobachtungen, wie das Auftreten eines Scheidentumors nach kurzfristiger Cyclophosphamidtherapie, Beobachtung eines cerebralen Retikulumzellsarkoms bei Leukämiekindern (SIMONE et al., 1972) sowie die erhöhte Malignomrate bei immunsuppressiven Organtransplantatempfängern (PENN et al., 1972), sind besorgniserregend.

Zu 3.:

Die derzeit von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung empfohlene Therapie der akuten Lymphoblastenleukämie orientiert sich in der remissionserhaltenden Therapie außer an der Richtdosis und der klinischen Toleranz vor allem an den Leukozyten des Patienten. Diese sollen 3500/mm^3 nicht übersteigen und 2000/mm^3 nicht unterschreiten. Je nachdem soll die Therapie reduziert oder erhöht und bei Werten unter 1500/mm^3 ganz abgesetzt werden. Nun ist aber ein Großteil der Patienten hierbei lymphopenisch, ein kleiner Prozentsatz zeigt im Differentialblutbild dagegen eine erhöhte Lymphozytenquote. Somit kann die tolerable Zytostatikadosis bereits überschritten sein, obwohl die Gesamtleukozytenzahl noch immer zwischen 2000 und 3500/mm^3 liegt, da die für die Infektabwehr wichtigsten Lymphozytensubpopulationen bereits in gefährliche Regionen abgefallen sind. Daher ist für eine

exakte Therapiesteuerung ihre Bestimmung sinnvoll.

Die weite Streuung der Lymphozytengesamtpopulation unserer Patienten ein Jahr nach Beginn der Therapie (in kompletter 1. Remission) zeigt die Abbildung 14.

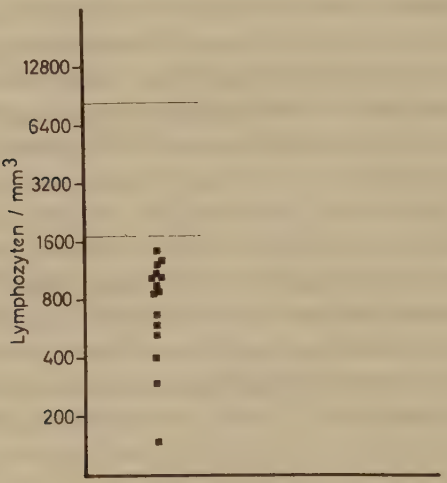

Abb.14: Blutlymphozyten ein Jahr nach Beginn der Kombinationszytostase (Richtdosis: Purinethol^{R} 50 mg/m^2/die, Methotrexat^{R} 20 mg/m^2/Woche, Endoxan^{R} 200 mg/m^2/Woche) bei 15 Patienten in erster hämatologischer Remission einer Lymphoblastenleukämie.
(Schraffierter Bereich: 95 % Bereich für entsprechende Altersgruppe, n. Wissenschaftlichen Tabellen, Geigy 1968)

Zu 4.:

Daß Tumorzellen - in vitro - durch Lymphoidzellen zerstört werden können, ist bekannt (Übersicht bei CEROTTINI und BRUNNER, 1974). Dazu sind einmal immune T-Lymphozyten in der

Lage, denn diese Zellen besitzen einen spezifischen Rezeptor für die Tumorzelloberfläche und in einem energieabhängigen Prozeß wird bei direktem Zellkontakt die Tumorzelle zerstört. Zum anderen können aber auch nicht-immune B-Zellen Tumorzellen zerstören, an deren Oberfläche sich Immunglobuline befinden. Denn ein Teil der B-Lymphozyten besitzt einen Rezeptor für das Fc-Fragment von IgG und durch diesen Rezeptor können sie mit der Tumorzelle Kontakt aufnehmen. Drittens können, nach den Untersuchungen von EVANS und ALEXANDER (1970), Makrophagen immunologisch spezifische Tumorzellen zerstören. Dazu ist nötig, daß immune T-Lymphozyten einen Faktor produzieren (SMAF), der an die Oberfläche von Makrophagen gelangt und die so ausgerüsteten, auch als armiert bezeichneten Makrophagen, können Tumorzellen immunologisch spezifisch zerstören. Außerdem gibt es noch eine unspezifische Tumorzellysis durch Makrophagen (MACKANESS, 1970). Welche Bedeutung diese Mechanismen aber in vivo haben, ist noch völlig unbekannt. Und eine Übertragung der in vitro-Resultate auf in vivo-Bedingungen ist nur mit Vorbehalt möglich. Denn die Funktion von in Kultur gehaltenen Lymphoidzellen ist ausgesprochen von den Kulturbedingungen abhängig. Dies erklärt auch die zum Teil unterschiedlichen in vitro-Resultate verschiedener Untersucher. Sicher wird aber in naher Zukunft - auch durch in vivo-Untersuchungen an Patienten (SCHWENK, im Druck) - geklärt sein, welche Lymphoidzellen einem Tumorwachstum förderlich und welche schädlich sind. Dann wird unsere Aufgabe sein, die zytostatische Therapie so zu steuern, daß diese wirtseigenen onkolytischen Faktoren maximal zur Wirkung kommen.

Für alle 4 Punkte ist - wie dargelegt - die Untersuchung von immunologischen Lymphozytensubpopulationen während der zytostatischen Therapie von entscheidender Bedeutung.

Im ersten Jahr der Kombinationszytostase erzeugen die drei "Reinduktionsphasen" wahrscheinlich aufgrund des Prednison-

zusatzes einen Anstieg der Leukozyten und die Lymphozyten/mm^3 Blut wechseln in diesem Zeitraum ständig. Daher haben wir bei 15 Patienten erst ein Jahr nach Beginn der Kombinationszytostase (± 2 Wochen) und mindestens 6 Wochen nach der letzten Steroidtherapie die Lymphozytenpopulationen bestimmt (Abb. 15). In den zuerst durchgeführten vorläufigen Experimenten, bei denen die Membranimmunfluoreszenzuntersuchungen ohne Neuraminidasebehandlung vorgenommen wurden (s.methodischer Teil), waren nur ganz wenige Zellen mit einer deutlichen Fluoreszenz behaftet, aber auch später war der Prozentsatz membranimmunglobulintragender Zellen deutlich vermindert (s.Abb.15). Hingegen war der Anteil der Lymphozytenpopulation mit T-Zellmarker unverändert, und zwar nicht nur ein Jahr nach Bestrahlungsende, sondern bei

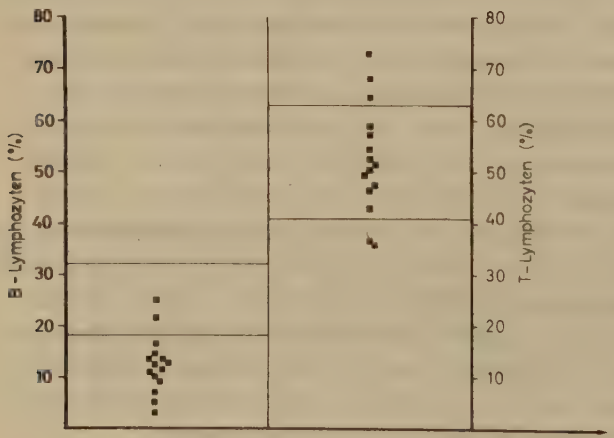

Abb.15: T- und B-Lymphozyten bei 15 Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie in erster hämatologischer Remission seit einem Jahr bei typischer Therapie (Richtdosis: s.Abb.14).
Schraffierter Bereich: Standardabweichung für Normalpersonen.

orientierenden Untersuchungen bereits wenige Monate nach prophylaktischer ZNS-Bestrahlung. Dieses impliziert aber, daß die Zellpopulation ohne beide Marker unter der Therapie zunimmt (sogenannte "U-Zellen"). Damit stehen diese Resultate im Gegensatz zu den Befunden von STJERNSWÄRD et al. (1972), die feststellten, daß nach Bestrahlung von Mammakarzinompatienten noch bis zu einem Jahr eine absolute und relative Reduktion der peripheren T-Lymphozyten nachweisbar bleibt. Genauso hatten Kinder mit akuter Lymphoblastenleukämie und prophylaktischer craniospinaler (!) Bestrahlung (CAMPBELL et al., 1973) noch lange Zeit eine reduzierte PHA-Stimulation ihrer Lymphozyten. Diese Diskrepanz der erhobenen Befunde - abgesehen von den bereits aufgeführten Vorbehalten gegen eine PHA-Stimulation als T-Zellparameter - mag dadurch erklärt werden, daß bei beiden Autorengruppen bei der Bestrahlung die Thymusregion eingeschlossen war im Gegensatz zu unserer ZNS-Bestrahlung, d.h. aber, nur bei einer Bestrahlung (Dosis?) der Thymusregion erfolgt auch eine relative Reduktion der peripheren T-Zellpopulation. Die Beobachtung von Karzinomen und Leukämien nach Thymusbestrahlung im Kindesalter (ROONEY und POWELL, 1959) mag damit in Zusammenhang gebracht werden, denn trotz niederer Strahlendosis (Hämangiomtherapie) wurde in dieser Region viel häufiger als Spätmanifestation eine Neoplasie beschrieben als bei einer Bestrahlung einer anderen Körperregion.

Eine Unterteilung der Patienten in prognostisch verschiedene Verlaufsformen erlaubt der Beobachtungszeitraum von 15 Monaten noch nicht. Ob durch diese Differenzierung der Lymphozyten eine praktische Frühdiagnose erhöhter Infektgefährdung gestattet,ist ungewiß. Bei zwei Patienten mit einer atypischen Pneumonie (F.M., J.M.) kontrollierten wir ab 3. bzw. 5. Tag vor Symptomenbeginn die Lymphozytensubpopulationen und fanden nicht die erwartete Reduktion der T-Lymphozyten. Dabei muß man sich vergegenwärtigen, daß sich im peripheren Blut nur 2 % der Lymphozyten des Organismus aufhalten. Und zahlreiche Zellkompartments

wie Milz, Lymphe, sind uns nur schwer zugängig (OSGOOD, 1954). Erste Beobachtungen zeigen nämlich (BORELLA und GREEN, 1972), daß mit der bereits kritisch bewerteten PHA-Stimulation in den einzelnen Kompartments deutliche Unterschiede bestehen können. So fand diese Arbeitsgruppe bei Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie im Knochenmark eine größere PHA-Stimulierbarkeit wie im peripheren Blut und wertete dies als eine relative Zunahme der T-Zellpopulation im Knochenmark unter der Kombinationszytostase, wahrscheinlich bedingt durch die Cyclophosphamidtherapie. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen an unsepariertem Knochenmarkspunktionsmaterial, und dies ist methodisch nur bedingt zuverlässig, da noch nicht erwiesen wurde, daß nur Lymphozyten nach PHA-Zusatz eine erhöhte DNS-Syntheserate aufweisen.

Mit den membranimmunglobulintragenden B-Lymphozyten und den rosettenbildenden T-Lymphozyten wurde erst der Anfang einer Lymphozytendifferenzierung während des Remissionsstadiums einer akuten Lymphoblastenleukämie vorgenommen. Entsprechend Tabelle 2 kann in naher Zukunft, falls Mikromethoden vorliegen, dies in ähnlicher Weise für die verschiedenen anderen Lymphozytenpopulationen gleichzeitig getan werden. Dann ist zu zeigen, ob sich unterschiedliche Krankheitsverläufe mit einem bestimmten Muster der Lymphozytensubpopulationen korrelieren lassen. Denn Lymphoidzellen sind wahrscheinlich an der Eliminierung von Blasten aus dem Organismus - nach chemotherapeutischer Remissionsinduktion - durch direkten Zellkontakt oder mittels Mediatoren beteiligt. Welche Lymphozytenpopulation dazu befähigt ist, blieb bisher unbekannt und kann durch diese klinische Verlaufsuntersuchung besser ermittelt werden als durch aufwendige in vitro-Experimente, deren Resultate eng mit den jeweiligen Kulturbedingungen verknüpft sind. Falls diese 'onkolytische' Zellpopulation erkannt wird, muß künftig bei der Chemotherapie beachtet werden, daß diese Zellen selektiv er-

halten bleiben. Die Folge wird sein, daß immunologische und chemotherapeutische Erwägungen, die sich heute noch oft widersprechen, gemeinsam für die Entfernung der malignen Zellproliferation bedeutsam sind.

Insgesamt wird also erwartet, daß die Blasten- wie die Lymphozytendifferenzierung im Remissionsstadium von zunächst prognostischem Wert ist, aber zu einem späteren Zeitpunkt, wenn wesentlich mehr Patienten mit zusätzlichen Zellmarkern untersucht wurden, auch direkte therapeutische Relevanz besitzen werden und so dem Arzt - in Ergänzung mit anderen zytochemischen, immunologischen und molekularbiologischen Techniken - ein Rüstzeug in die Hand geben, diese Patienten effektiver behandeln zu können als bisher.

Zusammenfassung

I.

Die Behandlungsresultate der akuten Lymphoblastenleukämie im Kindesalter konnten in den letzten Jahren teilweise erfreulich verbessert werden. So ist heute bei rund 40 % der erkrankten Kinder eine Langzeitremission über 5 Jahre und mehr zu erzielen. Aber bei einem großen Teil der Kinder ist auch die intensive Chemotherapie noch immer ungenügend. So muß es unser Ziel sein, die Prognose für diese Kinder durch eine Modifizierung der Behandlungsmaßnahmen weiter zu verbessern. Jedoch ist eine weitere generelle Intensivierung der Chemotherapie wie sie heute betrieben wird bei allen Patienten nicht möglich. Dies verbieten die zahlreichen jetzt schon beobachteten schweren Nebenwirkungen der Therapie, wie z.B. tödlich verlaufende Infektionen durch fakultativ pathogene Keime mit interstitieller Pneumonie und Sepsis, Anorexie und paralytische Ileussymptome. Vielmehr erscheint es notwendig, die Patienten, die auf die Therapie ungenügend ansprechen, also diejenigen mit erhöhtem Krankheitsrisiko, bereits bei der Diagnosestellung zu erkennen und herauszufinden. Daher wurde verschiedentlich versucht durch klinische, zytologische und zytochemische Parameter diese therapeutisch wichtige Frühprognose zu stellen. Alle bisherigen Methoden waren aber im Einzelfall unzuverlässig.

Um hierbei zu Fortschritten zu gelangen wurde daher folgender Versuch unternommen: Die Lymphoblasten wurden auf immunologische Zellmarker hin untersucht. Es wurde gefunden, daß sie dadurch differenziert werden können.

Es ergab sich nämlich, daß bei einem Teil der Lymphoblasten an der Oberfläche ein T-Zellmarker exprimiert wurde: es fand sich

eine Rosettenbildung mit nativen Schafserythrozyten unter definierten Bedingungen. Diese entsteht durch Rezeptoren an der Lymphoblastenoberfläche für ein Schafserythrozytenantigen. Es handelt sich hier um einen Zellmarker der sonst nur normale T-Lymphozyten kennzeichnet. Beim Krankheitsrezidiv war der Zellmarker erneut auf einem Großteil der Lymphoblasten im Blut, im Knochenmark und Liquor cerebrospinalis nachweisbar. Seine Konstanz wurde -in vitro- an einer eigens etablierten Lymphoblasten-Zelllinie über mehrere Monate verfolgt. Dies wurde an drei von insgesamt 17 Patienten festgestellt. Alle 3 Patienten verstarben im frühen hämatologischen Schub, obwohl zunächst eine Vollremission erzielt worden war, bereits innerhalb von 8 Monaten nach Diagnosestellung. Jeder dieser Patienten war an einer Meningiosis leucämica erkrankt, trotz einer vorausgegangenen prophylaktischen Bestrahlung des Zentralnervensystems.

Membranimmunglobuline, als wichtigster B-Zellmarker ließen sich mittels einer empfindlichen direkten Membranimmunfluoreszenztechnik nie auf den Lymphoblasten nachweisen. Beim Rosettentest wurde u.a. die Abhängigkeit der Rosettenausbeute von der Vorbehandlung der Erythrozyten und von der Inkubationsdauer, sowie vom Spender untersucht, und insgesamt die bisher unzureichende Standardisierung dieses prognostisch wichtigen T-Zellmarkers verbessert. Es gelang nicht, diesen Rosettentest durch einen neuen, gut reproduzierbaren Membranimmunfluoreszenztest zu ersetzen.

Ähnlich wie die Lymphoblastenleukämie verhalten sich die malignen Lymphome des Kindesalters (ausgenommen die Lymphogranulomatose). Unabhängig von dem Krankheitsstadium wird bei einheitlicher Therapie ein ganz unterschiedliches Ansprechen auf die Behandlung beobachtet.

Ein 3-jähriges Mädchen mit mediastinalem malignem Lymphom exprimierte auf den Tumorzellen und nach der leukämischen Transformation, bei einer frühen therapierefraktären Meningiosis, auf den

Lymphoblasten im Liquor cerebrospinalis wiederholt den beschriebenen T-Zellmarker. Somit dürfte diesem T-Zellmarker auch für diese Erkrankungsgruppe prognostische Bedeutung zukommen. Die Behandlungsresultate können somit erst weiter verbessert werden, wenn die mit dieser Methode erkannte Patientengruppe, für die die dargestellte Standardtherapie ungenügend ist, weiter differenziert behandelt werden kann. Hierzu bilden die Untersuchungen einen ersten Fortschritt.

II.

Die immunologische Differenzierung der Lymphozyten in ihre Untergruppen im Remissionsstadium ergab bei 15 Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie nach 1-jähriger Kombinationszytostase folgendes Resultat: insgesamt sind die Lymphozyten durch die Zytostase stark reduziert, wobei die einzelnen Subpopulationen unterschiedlich betroffen sind. Und zwar sind die T-Lymphozyten prozentual unverändert, während die B-Lymphozyten noch weiter vermindert sind; d.h. eine Lymphozytenpopulation ohne beide Zellmarker ist bei der beschriebenen Therapie vermehrt. Die Bedeutung liegt in der wichtigen Früherkennung von Phasen erhöhter Infektionsgefährdung und in der Therapiesteuerung.

LITERATUR

ABDOU, N.I., ABDOU, N.L.:

Bone marrow: The bursa equivalent in man?
Science 175: 446 (1972)

AISENBERG, A.C.:

Immunologic aspects of Hodgkin's disease.
Medicine 43: 189 (1964)

AISENBERG, A.C., BLOCH, K.J.:

Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes.
N.Engl.J.Med. 287, 272 (1972)

ALTMAN, A., COHEN, I.R., FELDMANN, M.:

Normal T-cell receptors for alloantigens.
Cell.Immunol. 7: 134 (1973)

AMROMIN, G.D.:

Nervous system, including orbital contents, middle and inner ear, semicircular canals.
In: Pathology of leukemia, Harper u. Rowe Publishers, New York 263 (1968)

AXÉN, R., PORATH, J.:

Chemical coupling of enzymes to cross-linked dextran (sephadex).
Nature London 210, 367 (1966)

BACH, J.F.:

Mechanism and Significance of rosette inhibition by anti-lymphocyte serum. Versailles 1970.
Series immunobiol. Standard 16, 189, Karger Basel,München, New York (1970)

BACH, M.L., BACH, F.H., JOO, P.:

Leukemia-associated antigens in the mixed leukocyte culture test.
Science 166: 1520 (1969)

BASTEN, A., MILLER, J.F.A.P., SPRENT, J., PYE, J.A.:

A receptor for antibody on B lymphocytes.
J.Exp.Med. 135, 610 (1972)

BELPOMME, D., DANTCHER, D., Du RUSQUEC, E., GRANDJON, D., HUCHET, R., POUILLART, P., SCHWARZENBERG, L., AMIEL, J.L., MATHÉ, G.:

T and B Lymphocyte markers on the neoplastic cell of 20 Patients with acute and 10 patients with chronic lymphatic leukemia.
Biomedicine 20, 109 (1974)

BENGELSDORFF, H.J., BERNHARDT, D.:

Die Marek'sche Krankheit der Hühner - Wesen, Bedeutung, Bekämpfung.
Behring Inst.Mitt. 52, 73 (1972)

BENNETT,J.M., HENDERSON, E.,S.:

Lymphoblastic leukemia.
Brit.Med.J. 2: 513 (1969)

BENNETT, J.M., KLEMPERER, M.R., SEGEL, G.B.:

Survival prediction based on morphology of lymphoblasts.
In: Acute leukemias nomenclature, classification, clinical trials, methodology and actuarial results.
G.MATHÉ, P.POUILLART, L.SCHWARZENBERG, 1.vol. Berlin-Heidelberg-New York, Springer 23 (1973)

BÖYUM, A.:

Isolation of leucocytes from human blood.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl. 97, 9-76 (1968)

BORELLA, L., GREEN, A.A.:

Sequestration of PHA-responsive cells (T-lymphocytes) in the bone marrow of leukemic children undergoing long-term immunosuppressive therapy.
J.Immunol. 109: 927 (1972)

BORELLA, L., GREEN, A.A., WEBSTER, R.G.:

Immunological rebound after cessation of long-term chemotherapy in acute leukemia.
Blood 40: 42 (1972)

BORELLA, L., WEBSTER, R.G.:

The immunosuppressive effects of long-term combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission.
Cancer Res. 31, 420 (1971)

BOYSE, E.A., OLD, J., STOCKERT, E.:

The TL (thymus leukemia) antigen: a review.
In: Immunopathology IV International Symposium.
GRABAR, P. and MIESCHER, P.A. Schwabe & Co. Stuttgart 23 (1965)

BRETSCHER, P.A., COHN, M.:

Minimal model for the mechanism of antibody induction or paralysis by antigen.
Nature (London) 220, 444 (1968)

BRONDZ, B.D.:

Lymphocyte Receptors and Mechanisms of in vitro cell-mediated immune reactions.
Transplant. Rev. 10: 112 (1972)

BROWN, G., GREAVES, M.F.:

Cell surface markers for human T and B lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 4, 302 (1974)

BURNET, F.M.:

A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection.
Aust.J.Sci. 20: 67 (1957)

BURNET, F.M.:

The concept of immunological surveillance.
Progr. exp. Tumor Res. 13: 1 (1970)

CAMPBELL, A.C., HERSEY, P., MacLENNAN, I.C.M., KAY,H.E.M.,PIKE,M.C.:

Immunsuppressive Consequences of Radiotherapy and Chemotherapy with acute lymphoblastic leukaemia.
Brit.Med.J. 1: 385 (1973)

CATOVSKY, D., GOLDMAN, J.M., OKOS, A., FRISCH, B., GALTON, D.A.G.:

T-lymphoblastic leukaemia: A distinct variant of acute leukaemia.
Brit.Med.J. 2, 643 (1974)

CEROTTINI, J.Ch., BRUNNER, K.T.:

Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity.
Advan.Immunol. 19: 67 (1974)

CEBRA, J.J., GOLDSTEIN, G.:

Chromatographic purification of globulin conjugates.
J.Immunol. 95, 230 (1965)

COOMBS, R.R.A., GURNER, B.W., WILSON, A.B., HOLM,G., LINDGREN,B.:

Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunglobulin receptors.
Int.Arch.Allergy.Appl.Immunol. 39, 658 (1970)

COOPER, A.G., BROWN, M.C., DERBY, H.A., WORTIS, H.H.:

Quantitation of surface-membrane and intracellular gamma, mu and kappa chains of normal and neoplastic human lymphocytes.
Clin.Exp.Immunol. 13, 487 (1973)

COOPER, M.D., LAWTON, A.R.:

Circulating B-cells in patients with immunodeficiency.
Amer.J.Pathol. 69, 513 (1972)

DAGUILLARD, F., FONTAINE, L., TARDIEU, M.:

B and T lymphocytes in chronic lymphatic leukaemia.
Lancet 1974, 1, 303

DORFMANN, R.F.:

Enzyme histochemistry of normal hyperplastic and neoplastic lymphoreticular tissues.
In: The Lymphoreticular Tumors in Africa.
F.C.ROULET, S.Karger Basel-New York, 304 (1964)

DUKOR, P., HARTMANN, K.U.:

Bound C_3 as the second signal for B-cell activation.
Cell. Immunol. 7, 349 (1973)

DWYER, J.M., WARNER, N.L., MacKAY, I.R.:

Specificity and nature of the antigen-combining sites on fetal and mature thymus lymphocytes.
J.Immunol. 108, 1439 (1972)

EHRLICH, P.:

Die Schutzstoffe des Blutes.
Dtsch.med.Wschr. 26: 913 (1901)

ESEKLAND, T., KLEIN, E.:

Isolation of 7 S IgM and kappa chains from the surface membrane of tissue culture cells derived from a Burkitt lymphoma.
J.Immunol. 107, 1368 (1973)

EVANS, R., ALEXANDER, P.:

Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity.
Nature (London) 228: 620 (1970)

FRÖLAND, S.S.:

Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes.
Scand.J.Immunol. 1, 269 (1972)

FUDENBERG, H.H., GOOD, R.A., GOODMAN, H.C., HITZIG, W., KUNKEL, H.G., ROITT, I.M., ROSEN, F.S., ROWE, D.S., SELIGMANN, M., SOOTHILL, J.F.:

Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee.
Pediatrics 47: 927 (1971)

GAJL-PECZALSKA, K.J., BIGGAR, W.D., PARK, B.H., GOOD, R.A.:

B lymphocytes in Di George syndrome.
Lancet 1: 1344 (1972)

GAJL-PECZALSKA, K.J., BALLOW, M., HANSEN, J., GOOD, R.A.:

IgE-bearing lymphocytes and atopy in a patient with x-linked infantile agammaglobulinemia.
Lancet 1: 1254 (1973)

GALILI, U., SCHLESINGER, M.:

The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells.
J.Immunol. 112: 1628 (1974)

GAVOSTO, F.:

Observations on the kinetics of acute lymphoblastic leukemia in relation to its division into subvarieties. In: Acute leukemias nomenclature, classification, clinical trials, methodology and actuarial results. G.MATHÉ, P.POUILLART und L.SCHWARZENBERG, Springer Berlin-Heidelberg-New York 3 (1973)

GLEICHMANN, H., GLEICHMANN, E.:

Immunosuppression and Neoplasia.
Klin.Wschr. 51, 255 (1973)

GLICK, B., CHANG, T.S., JAAP, R.G.:

The bursa of Fabricius and antibody production.
Poultry Sci. 35, 224 (1956)

GOOD, R.A., BIGGAR, W.D., PARK, B.:

Immunodeficiency in man. In: Progress in immunology.
AMOS, B. Academic Press Inc. New York, 700 (1971)

GOWANS, J.L.:

Immunobiology of the small Lymphocyte. In: Immunobiology.
GOOD, R.A., FISHER, D.W. Sinauer Ass.Inc. Stanford (1971)

GREY, H.M., RABELLINO, E., PIROFSKY, B.:

Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
J.Clin.Invest. 50, 2368 (1971)

GRABAR, P.:

"Self" and "not-self" in immunology.
Lancet 1: 1320 (1974)

GREAVES, M.F., JANOSSY, G.,DOENHOFF, M.:

Activation of human T and B lymphocytes by polyclonal mitogens.
Nature (London) 248: 698 (1974)

GUTTERMANN, J.U., ROSSEN, R.D., BUTLER, W.T., McCREDIE, K.B.
BODEY, G.P., FREIREICH, E.J., HERSH, E.M.:

Immunoglobulins on tumor cells and tumor-induced Lymphocyte
blastogenesis in human acute leukemia.
N.Engl.J.Med. 288: 169 (1973)

GUTTERMANN, J.U., McCREDIE, K.B., BODEY, G.P., RODRIGUEZ, V.,
FREIREICH, E.J.:

Lymphocyte blastogenesis to human leukaemia cells and their
relationship to serum factors, immunocompetence and prognosis.
Cancer Res. 32: 2524 (1972)

HAYHOE, F.G.J.:

The cytology and cytochemistry of acute leukemias.
Her Majesty's Stationary Office (London) (1964)

HELLSTRÖM, K.E., HELLSTRÖM, I.:

Cellular immunity against tumor antigens.
Advanc. Cancer Res. 12: 167 (1969)

HERSH, E.M., BODEY, G.P. NIES, B.A., FREIREICH, E.J.:

Causes of death in acute leukemia. A ten-year study of 414 patients from 1954-1963.
J.Amer.med.Ass. 193: 105 (1965)

JAFFÉ, E.S., SHEVACH, E.M., FRANK, M.M., BERARD, C.W., GREEN, I.:

Nodular lymphoma-evidence for origin from follicular B lymphocytes.
N. Engl. J. Med. 290, 813 (1974)

JOHANNSEN, R., CARLSSON, A.B., HAUPT, H., HEIDE, K.:

Human-Blutproteine mit Hemmwirkung auf die Lymphozyten-transformation in vitro.
Behring Inst. Mitt. 54: 33 (1974)

JOHNSON, H.D., JOHNSON, W.W.:

Pneumocystis carinii pneumonia in children with cancer. Diagnosis and treatment.
J.Amer.med.Ass. 214: 1067 (1970)

JONDAL, M., HOLM, G., WIGZELL, H.:

Surface markers on human T and B lymphocytes. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells.
J.Exp.Med. 136, 207 (1972)

KADIN, M.E., NEWCOM, S.R., GOLD, S.B., STITES, D.P.:

Origin of Hodgkin's cell.
Lancet 2, 167 (1974)

KLEIN, E., CLIFFORD, P., KLEIN, G.:

Further studies on the membrane immunfluorescence reaction of Burkitt lymphoma cells.
Int.J.Cancer 2, 27 (1967)

KLEIN, G.:

Tumor antigens.
Ann.Rev.Microbiol. 20, 223 (1966)

KLEIN, G., CLIFFORD, P., KLEIN, E., STJERNSWÄRD, J.:

Search for tumor-specific immune reactions in Burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 55: 1628 (1966)

KERSEY, J.H., GAJL-PECZALSKA, K.J., NESBIT, M.E.:

The lymphoid system: Abnormalities in immunodeficiency and malignancy.
J.Pediatr. 84, 789 (1974)

KERSEY, J.H., SPECTOR, B.D., GOOD, R.A.:

Cancer in children with primary immunodeficiency disorders.
J.Pediatr. 84, 263 (1974)

LAMPERT, F.:

Krebs im Kindesalter.
Urban u. Schwarzenberg München-Berlin-Wien (1972)

LAURIE, H.C.:

Duration of remissions in lymphoblastic leukaemia in childhood.
Brit.Med.J. II 95 (1968)

LAY, W.H., MENDES, N.F., BIANCO, C., NUSSENZWEIG, V.:

Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes.
Nature (London) 230, 531 (1971)

LEDERER, L.-D.:

Histochemie und Cytochemie der Leukosen. In: Leukämie.
GROSS, R., van der LOO, J., Springer Berlin-Heidelberg-New York 99 (1972)

LEE, S.L., LIVINGS, D., JAMES, G.W., SCHROEDER, L., SELAWRY, O., STICKNEY, J.M.:

Morphologic classification of acute leukemias.
Cancer Chemother.Rep. 16, 151 (1962)

LENNERT, K.:

Arbeitstagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung im Kindesalter.
Frankfurt/M. Juni 1974

LENNERT, K.:

Origin of malignant lymphomas.
Lancet 2, 586 (1974 b)

LEVIS, W.R., ROBBINS, J.H.:

Function of glass-adherent cells in lymphocyte cultures.
Fed.Proc. 28, 566 (1969)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.biol.Chem. 193, 265 (1951)

LUCKASEN, J.R., SABAD, A., GAJL-PECZALSKA, K.J., KERSEY, J.H.:

Lymphocytes bearing complement receptors, surface immunoglobulins and sheep erythrocyte receptors in primary immunodeficiency. diseases.
Clin.Exp.Immunol. 16, 535 (1974)

MACKANESS, G.B.:

The mechanism of macrophage activation. In: Infectious agents and host reactions.
W.B. Saunders Philadelphia 61 (1970)

MACKANESS, G.B.:

Cellular immunity. In: Mononuclear phagocytes.
Furth.Blackwell, Oxford 461 (1970)

MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E., ATWELL, J.L.:

Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins.
J.Exp.Med. 135, 956 (1972)

MATHÉ, G.:

Immunotherapy in the treatment of acute lymphoid leukemia.
Hosp. Prac. 6: 43 (1971)

MATHÉ, G., POUILLART, P., STERESCU, M., AMIEL, J.L., SCHWARZENBERG, L., SCHNEIDER, M., HAYAT, M., de VASSAL, F., JASMIN, C., LAFLEUR, M.:

Subdivision of classical varieties of acute leukaemia. Correlation with prognosis and cure expectancy.
Europ.J.clin.biol.Res. 16, 554 (1971)

MATHÉ, G., BELPOMME, D.:

T and B lymphocytic nature of leukemia and lymphosarcomas. A new but still uncertain parameter for their classification. Biomedicine 20, 81 (1974)

MERCIER, P.:

Rosettes and immunocyto-adherence. Biomedicine 20, 131 (1974)

METCALF, D., MOORE, M.A.S.:

"Hemopoietic cells: Their origin, migration and differentiation" North-Holland Publ. Amsterdam (1971)

MICHLMAYR, G., HUBER,Ch., FINK,U., FALKENSAMMER, M., HUBER, H.:

T-Lymphozyten in peripherem Blut und Lymphknoten bei lymphatischen Systemerkrankungen. Schweiz.med.Wschr. 104: 815 (1974)

OLD, L.J., BOYSE, E.A.:

Immunology of experimental tumors. Ann.Rev.Med. 15: 167 (1964)

ORDER, S.E., HELLMAN, S.:

Pathogenesis of Hodgkin's disease. Lancet 1, 571 (1972)

OSGOOD, E.E.:

Number and distribution of human hemic cells. Blood 9: 1141 (1954)

OSUNKOYA, B.O., MOTTRAM, F.C., ISOUN, M.J.:

Synthesis and fate of immunological surface receptors on cultured Burkitt lymphoma cells. Int.J.Cancer 4: 159 (1969)

PAPAMICHAIL, M., BROWN, J.C., HOLBOROW, E.J.:

Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. Lancet 2: 850 (1971)

PAVLOVSKY, S., EPPINGER-HELFT, M., MURIEL, F.S.:

Factors that influence the appearance of central nervous system leukemia.
Blood 42: 935 (1973)

PENN, I., STARZL, T.E.:

Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipients.
Transplant.14: 407 (1972)

PERLMANN, P., PERLMANN, H., WIGZELL, H.:

Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells.
Transplant.Rev.13, 91 (1972)

PERNIS, B., FERARIN, M., FORNI, L., AMANTE, L.:

Immunoglobulins on lymphocyte membranes. In: Progress in immunology.
Academic Press Inc. New York 95 (1971)

PHILLIPS, B., ROITT, I.M.:

Evidence for transformation of human B lymphocytes by PHA.
Nature (London) 241: 254 (1973)

PIERCE, M.I., BORGES, W.H., HEYN, R., WOLFF, J.A., GILBERT, E.S.:

Epidemiological factors and survival experience in 1770 children with acute leukemia.
Cancer 23: 1296 (1969)

PIESSENS, W.F., SCHUR, P.H., MOLONEY, W.C., CHURCHILL, W.H.:

Lymphocyte surface immunoglobulins.
N.Engl.J.Med. 288: 176 (1973)

PINKEL, D.:

Treatment of acute lymphocytic leukemia.
Leukemia Research Fund (London) 1 (1973)

PINKEL, D., HERNANDEZ, K., BORELLA, L., HOLTON, C., AUR, R.J.A., SAMOY, G., PRATT, C.:

Drug dosage and remission duration in childhood lymphocytic leukemia.
Cancer 27: 247 (1971)

PLÜSS, H.J.:

Prognostische Wandlung der kindlichen Leukämie.
Therapeut.Umsch. 31, 558 (1974)

PREUD'HOMME, J.L., SELIGMANN, M.:

Immunoglobulins on the surface of lymphoid cells in Waldenström's macroglobulinemia.
J.Clin.Invest. 51: 701 (1972)

PREUD'HOMME, J.L., SELIGMANN, M.:

Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases.
Blood 40, 477 (1972)

RAFF, M.:

Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice.
Transplant.Rev. 6: 52 (1971)

RAPPAPORT, H.:

Tumours of the hemopoietic system.
Atlas of Tumor Pathology. Washington (1966)

REBUCK, J.W., CROWLEG, J.H.:

A method of studying leukocytic functions in vivo.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 59, 757 (1955)

ROONEY, D.R., POWELL, R.W.:

Carcinoma of the thyroid after x-ray therapy in early childhood. J.Amer.med.Ass. 161: 1 (1959)

ROWE, D.S., HUG, K., FORNI, L., PERNIS, B.:

Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor.
J.Exp.Med. 138, 965 (1973)

ROWE, D.S., HUG, K., FAULK, W.P., McCORMICK, J.N., GERBER, H.:

IgD on the surface of peripheral blood lymphocytes of the human newborn.
Nature (New Biol.) 242: 155 (1973)

SCHWENK, H.U., LEHMANN-GRUBE, F.:

The localized hemolysis-in-gel method adapted to the detection of spleen cells releasing virus-specific antibodies.
J.Immunol. 104: 1184 (1970)

SCHWENK, H.U., TRUCKENBRODT, H.:

Zur Pathophysiologie der gestörten Infektabwehr.
Fortschr.Med. 90, 467 (1972)

SCHWENK, H.U., GIMPERT, E., PLÜSS, H.J., PILGRIM, U., HITZIG, W.H.:

Lymphocyte markers for B- and T-cells in primary immunodeficiency diseases.
Klin.Wschr. 52, 426 (1974a)

SCHWENK, H.U.:

Immunological cell markers on lymphoblasts of patients with acute lymphatic leukemia.
Z.Kinderheilk. 118: 87 (1974b)

SCHWENK, H.U.:

Immunologische Verlaufskontrollen beim Neuroblastom.
M.Kinderheilk. (im Druck)

SEILER, F.R., SEDLACEK, H.H., KANZY, E.J., LANG, W.:

Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptorrosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Inst.Mitt. 52: 26 (1972)

SELIGMANN, M.:

B-cell and T-cell markers in lymphoid proliferations.
N.Engl.J.Med. 291: 1484 (1974)

SELIGMANN, M., PREUD'HOMME, J.-L., BROUET,J.C.:

B and T cellmarkers in human proliferative blood diseases and primary immunodeficiencies with special reference to membrane bound immunoglobulins.
Transplant.Rev. 16, 85 (1973)

SEN, L., BORELLA, L.:

Expression of cell surface markers on T and B lymphocytes after long-term chemotherapy of acute leukemia.
Cell.Immunol. 9: 84 (1973)

SHEVACH, E., EDELSON, R., FRANK, M., LUTZNER, M., GREEN, J.:

A human leukemia cell with both B and T cell surface receptors.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 71: 863 (1974)

SIEGEL, I., GRIECO, M.H., GUPTA, S.:

Subpopulations of B lymphocytes in human tonsils and peripheral blood.
Lancet 2, 215 (1974)

SIMONE, J.V., HOLLAND, E., JOHNSON, W.:

Fatalities during remissions of childhood leukemia.
Blood 39: 759 (1972)

SJÖGREN, H.O.:

Transplantation methods as a tool for detection of tumor specific antigens.
Progr.exp.Tumor Res. 6, 289 (1965)

SMITH, J.L., BARKER, C.R., GLEIN, G.P., COLLINS, R.D.:

Characterization of malignant mediastinal lymphoid neoplasm (Sternberg sarcoma) as thymic in origin.
Lancet 2, 74 (1973)

STATHOPOULOS, G., DAVIES, A.J., PAPAMICHAIL, M., HOLBOROW, E.J., WITHSHAW, E.:

Origin of malignant cells in lymphoma apparently originating in anterior mediastinum.
Lancet 1, 927 (1974)

STERNBERG, C.:

Leukosarcomatose und Myeloblastenleukämie.
Beitr.Z.path.Anat.Path. 61, 75 (1916)

STJERNSWÄRD, J., JONDAL, M., VANKY, F., WIGZELL, H., SEALY, R.:

Lymphopenia and change in distribution of human B and T Lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma.
Lancet 1: 1352 (1972)

THOMAS, L.:

Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity states.
Hoeber P.B.Inc. New York (1959)

THOMAS, L.B.:

Pathology of leukemia in the brain and meninges: postmortem studies of patients with acute leukemia and of mice given inoculations of L 1210 leukemia.
Cancer Res. 25: 1555 (1965)

VIOLA, M.V.:

Acute leukemia and infection.
J.Amer.med.Ass., 201, 923 (1967)

WAHLEN, W., PAPPAS, A., SCHWARZ, G., KAUSCH, O.:

Cell-mediated immunity in leukemic children during remission undergoing longterm chemotherapy.
Klin.Päd. 186: 165 (1974)

WARNER, N.L.:

Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T Lymphocytes.
Advanc.Immunol. 19: 67 (1974)

WEINER, M.S., BIANCO, C., NUSSENZWEIG, V.:

Enhanced binding of neuraminidase-treated sheeps erythrocytes to human T lymphocytes.
Blood 42, 939 (1973)

WILSON, J.D., NOSSAL, G.,J.,V.:

Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia.
Lancet 2: 788 (1971)

WINZELER, R.J., HARRIS, E.D., PEKAS, D.J., JOHNSON, C.A., WEBER, P.:

Studies on glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes.
Biochemistry 6: 2195 (1967)

WYBRAN, J., CARR, M.C., FUDENBERG, H.H.:

The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus derived cells.
J.Clin.Invest. 51: 2537 (1972)

WYBRAN, J., CHANTLER, S., FUDENBERG, H.H.:

Isolation of normal T cells in chronic lymphatic leukemia.
Lancet 1: 126 (1973)

WYBRAN, J., FUDENBERG, H.H.:

Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases.
J.Clin.Invest. 52: 1026 (1973)

ZUCKER-FRANKLIN, D.J.:

The percentage of monocytes among "mononuclear" cell fractions obtained from normal human blood.
J.Immunol. 112: 234 (1974)

BUCHDRUCKEREI LUDWIG MÜLLER ERLANGEN